

Université de Sherbrooke

Analyse de biomarqueurs au niveau cellulaire de patients atteints de la maladie de Fabry en utilisant la spectrométrie de masse en tandem

Par

Amanda Toupin

Programme de Sciences des radiations et imagerie biomédicale

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)
en Sciences des radiations et imagerie biomédicale

Sherbrooke, Québec, Canada
Octobre 2017

Membres du jury d'évaluation

Christiane Auray-Blais, LL.M., Ph.D., Département de pédiatrie, Université de Sherbrooke
Darel Hunting, Ph.D., Département de médecine nucléaire et radiobiologie, Université de Sherbrooke
Dr Joe TR Clarke, Département de pédiatrie, Université de Toronto

© Amanda Toupin, 2017

À mes parents, Sandra et Éric
À Shanelle
À Christiane

RÉSUMÉ

Analyse de biomarqueurs au niveau cellulaire de patients atteints de la maladie de Fabry en utilisant la spectrométrie de masse en tandem

Par

Amanda Toupin

Programme de sciences des radiations et imagerie biomédicale

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en Sciences des radiations et imagerie biomédicale, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

La maladie de Fabry est une maladie de surcharge lysosomale liée au chromosome X. Elle est causée par une mutation au niveau du gène *GLA* qui provoque un déficit de l'enzyme α -galactosidase A. Elle entraîne une accumulation de glycosphingolipides tels le globotriaosylcéramide (Gb₃), le globotriaosylsphingosine (lyso-Gb₃) et galabiosylcéramide (Ga₂) ainsi que leurs isoformes/analogues respectifs au niveau des tissus et des liquides biologiques des patients. Les symptômes peuvent se présenter de manière très variable soit par de l'acroparesthésie, des troubles ophtalmologiques, des angiokératomes, des troubles cardiaques, rénaux ou encore neurologiques. Les connaissances au niveau physiopathologique de la maladie de Fabry sont à ce jour, toujours déficientes. Les biomarqueurs analysés ne permettent pas de prédire la sévérité et la progression de la maladie. Afin d'apporter des connaissances plus approfondies à ce niveau, l'objectif principal de cette étude était d'analyser les biomarqueurs au niveau cellulaire pour des patients atteints de la maladie. Les objectifs secondaires étaient: 1) de développer et de valider une méthode en spectrométrie de masse en tandem pour la quantification relative et simultanée de certains biomarqueurs susmentionnés dans les leucocytes, les lymphocytes B et les monocytes de patients Fabry et contrôles sains; 2) d'évaluer les biomarqueurs dans le total des leucocytes, les lymphocytes B, les monocytes, le plasma et l'urine chez les patients Fabry et les contrôles sains appariés selon le sexe et l'âge; et 3) d'établir des corrélations entre la quantité relative de ces biomarqueurs et le génotype des patients traités et non traités. Les résultats de cette étude démontrent qu'il n'y a pas de changements significatifs dans la distribution des groupes d'isoformes/analogues du Gb₃ selon le type cellulaire pour les patients et les contrôles. La découverte d'isoformes/analogues méthylés du Gb₃ suggère un processus de méthylation qui se produit directement au niveau des cellules sanguines et particulièrement pour les lymphocytes B et les monocytes. Des corrélations face à la quantité de biomarqueurs et le génotype ont été établies. Ces résultats pourraient permettre une meilleure compréhension des processus biochimiques reliés à l'accumulation du Gb₃ dans les cellules sanguines.

Mots clés : Maladie de Fabry, spectrométrie de masse en tandem, biomarqueurs, Globotriaosylcéramide (Gb₃), leucocytes, lymphocytes B, monocytes

Table des matières

Résumé	iii
Table des matières	iv
Liste des figures.....	vi
Liste du tableau	ix
Liste des abréviations	x
Introduction.....	1
1.1 Les maladies génétiques.....	1
1.1.1 Les maladies orphelines.....	1
1.1.2 Les erreurs innées du métabolisme	1
1.1.3 Les types de mutations.....	3
1.1.4 Les modes de transmission des gènes	5
1.1.5 La variabilité génétique.....	8
1.2 Les maladies lysosomales	10
1.2.1 Aspects généraux.....	10
1.2.2 Fonctions des lysosomes	10
1.2.3 Formation des lysosomes.....	11
1.2.4 Pathologies associées aux lysosomes	12
1.3 La maladie de Fabry	13
1.3.1 Description de la maladie de Fabry.....	13
1.3.2 Signes et symptômes	14
1.3.2.1 Troubles cardiovasculaires.....	15
1.3.2.2 Troubles rénaux	16
1.3.2.3 Troubles neurologiques	16
1.3.2.4 Troubles dermatologiques.....	17
1.3.2.5 Troubles ophtalmologiques.....	18
1.3.2.6 Troubles gastro-intestinaux	18
1.3.2.7 Troubles psychologiques	18
1.3.3 Dépistage et diagnostic.....	19
1.3.4 Thérapie d'enzyme de remplacement.....	20
1.3.5 Thérapie génique	22
1.3.6 Autres thérapies.....	22
1.4 Les biomarqueurs.....	23
1.4.1 Définition d'un biomarqueur	23

1.4.2	Caractéristiques d'un biomarqueur idéal	23
1.4.3	Biomarqueurs de la maladie de Fabry	24
1.5	Principes de la spectrométrie de masse en tandem.....	28
1.5.1	Principes généraux.....	28
1.5.2	Principe de la chromatographie liquide ultra performante (UPLC).....	30
1.5.3	Principes de l'électronébulisation	31
1.5.4	Différents modes d'acquisition de l'analyseur	32
1.5.5	Standard interne	35
1.5.6	Effets de matrice	36
1.6	Le sang périphérique.....	37
1.6.1	Les érythrocytes.....	37
1.6.2	Le plasma	38
1.6.3	Les leucocytes	38
1.7	Les caractéristiques des cellules de patients Fabry	41
1.7.1	Perturbation des leucocytes associée à la maladie de Fabry.....	41
1.7.2	Apoptose des cellules de patients Fabry.....	41
1.7.3	Localisation du Gb ₃ intracellulaire.....	42
1.8	La présentation du projet	42
1.8.1	Problématiques et hypothèse entourant la maladie de Fabry	42
1.8.2	Objectifs	43
1.8.3	Isolation et purification des différents types cellulaires	43
1.8.4	Optimisation des paramètres	49
1.8.4.1	Optimisation de l'extraction du Gb ₃	49
1.8.4.2	Optimisation des paramètres de la chromatographie liquide	50
1.8.4.3	Optimisation des paramètres de la spectrométrie de masse	55
1.8.5	Validation de la méthode.....	57
Article 1	60
Discussion	158
Conclusions	162
Remerciements	164
Liste des références	165

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Exemples de mutations au niveau des gènes pouvant modifier la séquence d'acides aminés.....	5
Figure 2	Exemple de transmission d'une maladie héréditaire dominante	6
Figure 3	Exemples de transmission d'une maladie héréditaire récessive: A) un des deux parents est atteint de la maladie récessive; B) les deux parents sont porteurs de la maladie récessive.....	7
Figure 4	Exemples de transmission d'une maladie héréditaire liée au chromosome X: A) le père est atteint de la maladie; B) la mère est porteuse de la maladie	8
Figure 5	Exemples d'inactivation du chromosome X muté: A) femme avec une inactivation du chromosome X muté majoritaire dans ses cellules, donc moins atteinte par la maladie liée au chromosome X; B) femme avec une inactivation du chromosome X muté minoritaire dans ses cellules, donc plus atteinte par la maladie liée au chromosome X	9
Figure 6	Structure de la molécule de globotriaosylcéramide Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)], soit une molécule appartenant au groupe des isoformes et analogues saturés du Gb ₃ . Présentation des 5 groupes du Gb ₃ avec les différentes modifications possibles menant aux groupes de Gb ₃ méthylés, insaturés avec une double liaison au niveau de l'acide gras ou de la sphingosine, insaturé avec deux doubles liaisons, sur l'acide gras et la sphingosine, ou les deux doubles liaisons sur l'acide gras et du groupe avec une sphingosine hydratée.....	25
Figure 7	Structure de la molécule du galabiosylcéramide (Ga ₂).	25
Figure 8	Structure de la molécule du globotriaosylsphingosine (lyso-Gb ₃).....	27
Figure 9	Composantes d'un spectromètre de masse.....	30
Figure 10	Principes de l'électronébulisation en mode positif en spectrométrie de masse ...	32
Figure 11	Quadripôle et ses 4 tiges métalliques pairées	33
Figure 12	Principe d'un spectromètre de masse en tandem en mode d'acquisition de Monitoring de Réactions Multiples (MRM)	34

Figure 13 Différenciation des cellules souches hémocytoblastes en cellules plus spécialisées, notamment en leucocytes regroupant les lymphocytes T, les lymphocytes B, cellules cytotoxiques naturelles, les monocytes, les éosinophiles, les neutrophiles et les basophiles.....	39
Figure 14 Résultat de l'isolation des leucocytes à partir d'une solution de dextran à 6%, suite à 1 h d'incubation à 37 °C.....	44
Figure 15 Résultat de la séparation du culot de leucocytes non purifié et contaminé par des globules rouges résiduels	44
Figure 16 Support magnétique utilisé pour retenir les cellules liées aux anticorps et couplées aux billes magnétiques	45
Figure 17 Globules rouges éliminés du culot de leucocytes suite à l'incubation sur le support magnétique de l'échantillon avec l'ajout des anticorps de glycophorines A et des billes magnétiques... ..	46
Figure 18 Comparaison de la réponse de certains isoformes et analogues du Gb ₃ , analysés en spectrométrie de masse en tandem à partir d'échantillons de lymphocytes B traités avec une solution tampon contenant 2.0% de FBS ou avec une solution tampon contenant 0.5% de BSA. La réponse était normalisée par le standard interne Gb ₃ (d18:1)(C18:0)D3.....	47
Figure 19 Comparaison de la réponse de certains isoformes et analogues du Gb ₃ , analysés en spectrométrie de masse en tandem à partir d'échantillons de lymphocytes B traités avec une solution tampon contenant 2.0% de FBS ou avec une solution tampon contenant 0.5% de BSA. La réponse était normalisée par le standard interne Gb ₃ (d18:1)(C18:0)D3.....	47
Figure 20 Résultats de l'isolation des lymphocytes B ou des monocytes avec la procédure RosetteSep: A) Ajout du cocktail d'anticorps de RosetteSep; B) Ajout du gradient de densité; C) Séparation des phases suite à la centrifugation de l'échantillon ...	48
Figure 21 Résultats du test d'infusion continue de Gb ₃ [(d18:1)(C17:0)] combinée à l'injection d'échantillon de leucocytes afin de vérifier s'il y a présence d'effet de matrice : A) avec un ajout de 850 µL de KOH; B) sans ajout de KOH.. ..	50
Figure 22 Impact de différents gradients ou de différents débits lors de la chromatographie liquide sur l'élution des molécules d'intérêt: A) chromatographie débutant à 75%	

de phase organique, augmentation linéaire jusqu'à 100% de phase organique et débit à 0.5 mL/min; B) chromatographie débutant à 50% de phase organique, augmentation linéaire jusqu'à 100% de phase organique et débit à 0.5 mL/min; et C) chromatographie débutant à 50% de phase organique, augmentation linéaire jusqu'à 100% de phase organique et débit à 0.25 mL/min...	51
Figure 23 Chromatographie liquide des 22 isoformes et analogues du Gb3 ainsi que le standard interne Gb3(d18:1)(C18:0)D3	52
Figure 24 Résultats de l'infusion continue de Gb ₃ [(d18:1)(C17:0)] combinée à l'injection des échantillons afin de vérifier s'il y a présence d'effets de matrice : A) échantillon de leucocytes totaux; B) échantillon de lymphocytes B; et C) échantillon de monocytes.....	53
Figure 25 Résultats d'un chromatogramme et de spectres de fragmentation de la molécule Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]: A) Chromatogramme obtenu pour la molécule d'intérêt; B) Spectre de masse avec un pic interférent présent à 8.56 minutes; et C) Spectre de masse avec un pic de la molécule d'intérêt présent à 8.76 minutes identifié grâce au rapport <i>m/z</i> spécifique aux fragments de la molécule d'intérêt.....	55
Figure 26 Spectromètre de masse en tandem de type Xevo TQ-S (à droite) couplé à un chromatographe liquide en ultra-performance de type ACQUITY UPLC I-CLASS (à gauche)	56
Figure 27 Optimisation de l'énergie de collision grâce à la fonction Intellistart du spectromètre de masse en tandem. Le résultat optimal a été atteint à 26 V.....	56
Figure 28 Optimisation du voltage du cône grâce à la fonction Intellistart du spectromètre de masse en tandem. Le résultat optimal a été atteint à 34 V	57
Figure 29 Isolation des leucocytes par la solution de dextran à 6% et récupération de la phase supérieure contenant le plasma et les leucocytes : A) leucocytes isolés 1 h après le prélèvement sanguin; B) leucocytes isolés 24 h après le prélèvement sanguin ...	59
Figure 30 Résultats démontrant la stabilité de certains isoformes et analogues du Gb ₃ présents dans le sang lorsque les leucocytes totaux sont isolés soit 1 h, 6 h, 8 h, 12 h ou 24 h après le prélèvement.....	59

LISTE DU TABLEAU

Tableau 1 Paramètres à valider lors du développement d'une méthode	57
--	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

α -Gal A	Alpha-galactosidase A
A	Adénine
ADN	Acide désoxyribonucléique
APCI	Ionisation chimique à pression atmosphérique
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
AVC	Accident vasculaire cérébral
BH ₄	Tétrahydrobioptérine
BSA	Albumine de sérum bovin (« Bovine Serum Albumin »)
C	Cytosine
Cellules NK	Cellules cytotoxiques naturelles
CORD	Canadian Organization for Rare Disorders
CFDI	Canadian Fabry Disease Initiative
EDTA	Éthylène diamine tétra-acétique
EIM	Erreur innée du métabolisme
ESI	Ionisation par électronébulisation (« Electrospray Ionization »)
FAB	Ionisation par bombardement d'atomes rapides (« Fast Atom Bombardment »)
FBS	Sérum fœtal bovin (« Foetal Bovine Serum »)
G	Guanine
Ga ₂	Galabiosylcéramide
Gb ₃	Globotriaosylcéramide
GC	Chromatographie en phase gazeuse (« Gas Chromatography »)
HPLC	Chromatographie liquide haute performance (« High Performance Liquid Chromatography »)
IC	Ionisation chimique
IE	Ionisation électronique
IRM	Imagerie par résonance magnétique

Lyso-Gb ₃	Globotriaosylsphingosine
<i>m/z</i>	Rapport masse sur charge
M6P	Mannose-6-phosphate
MALDI	Désorption-ionisation laser assistée par matrice
MRM	Monitoring de réactions multiples
PAH	Phénylalanine hydroxylase
PBS	Tampon phosphate salin (« Phosphate Buffered Saline »)
T	Thymine
TER	Thérapie d'enzyme de remplacement
TOF	Temps de vol (« Time of flight »)
U	Uracile
UPLC	Chromatographie liquide ultra performance (« Ultra Performance Liquid Chromatography »)
UPLC-MS/MS	Chromatographie liquide ultra performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (« Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry »)

INTRODUCTION

1.1 Les maladies génétiques

1.1.1 Les maladies orphelines

Une maladie rare, aussi appelée maladie orpheline, se définit au Canada comme étant une maladie atteignant moins de 1/2000 personnes dans une population. Cette définition peut varier selon différents pays. À ce jour, entre 6000 et 8000 maladies orphelines ont été identifiées et l'on estime que 80% d'entre elles sont causées par un trouble génétique (Das 2016). La majorité des patients atteints de maladies orphelines, soit environ 75% d'entre eux, sont des enfants étant donné que ces maladies sont souvent ravageuses, difficiles à diagnostiquer et trop souvent impossibles à traiter (Das 2016). De tous les patients atteints de maladies orphelines, 30% ne se rendront pas à leur cinquième anniversaire (Das 2016).

Individuellement et due à leur rareté, ces maladies touchent très peu la population, ce qui rend la recherche scientifique possiblement moins attrayante et les solutions de traitement plus difficiles à cerner pour les personnes atteintes. Par ailleurs, lorsqu'elles sont regroupées, ces maladies ont un grand impact pour la société. Au total, on estime que 6 à 8% de la population mondiale est touchée par une maladie orpheline (Angelis et al. 2015). Au Canada 3 millions de personnes sont atteintes d'une maladie rare (Canadian Organization for Rare Disorders (CORD), 2016).

1.1.2 Les erreurs innées du métabolisme

Les erreurs innées du métabolisme (EIM) sont un regroupement de maladies génétiques ayant en commun des troubles dans diverses voies métaboliques causées par le défaut d'un seul gène. Ce groupe de maladies est très hétérogène autant par la présentation clinique, le phénotype, que pour les types de mutations, soit le génotype des patients atteints (Sandlers, 2017).

Les EIMs peuvent être causées par le déficit d'une enzyme normalement présente qui doit assurer la transformation des molécules, permettant ainsi la poursuite de la voie métabolique, mais qui dans le cas des EIM est sous-exprimée ou non-exprimée, menant ainsi à

l'accumulation du substrat. L'enzyme peut aussi être exprimée, mais de manière non-fonctionnelle, par exemple dans le cas d'une mauvaise conformation ou repliement de celle-ci, ce qui la priverait d'exercer ses fonctions usuelles. Elles peuvent également être causées par le déficit d'un transporteur; les molécules de substrats, dans ce cas, ne peuvent donc pas être transformées pour poursuivre la voie métabolique habituelle, étant donné leur confinement dans un compartiment cellulaire et aussi dû au fait que l'enzyme permettant ce processus se trouve dans un autre compartiment cellulaire. Le déficit du transporteur empêche ainsi les réactions de se produire et mène à l'accumulation de substrat dans un compartiment cellulaire précis (Das, 2016). Les EIM peuvent aussi être le résultat du déficit d'un cofacteur nécessaire au fonctionnement d'une enzyme essentielle d'une voie métabolique menant ainsi à l'accumulation de substrat. C'est le cas pour certains patients atteints de phénylcétonurie, l'enzyme phénylalanine hydroxylase (PAH) est présente et fonctionnelle, mais son cofacteur, la tétrahydrobioptérine (BH₄) (OMIM no. 261630 et 261640), n'est pas synthétisé par le patient (Blau, 2016). Finalement, les EIM peuvent être causées par la perte de rétro-inhibition causant une trop grande conversion de substrats en produits, menant ainsi à l'accumulation de ceux-ci (Rao et al., 2009).

Ces défauts de voies métaboliques peuvent provoquer des désordres au niveau du métabolisme des protéines, notamment des aminoacidopathies, des aciduries organiques et des déficits du cycle de l'urée, mais également des désordres au niveau du métabolisme des glucides, c'est le cas pour les maladies liées à l'entreposage du glycogène. Des désordres au niveau du métabolisme des lipides sont aussi observés, tels les défauts d'oxydation des acides gras. Les EIMs peuvent également causer des problèmes de surcharge lysosomale, telles la maladie de Fabry et la maladie de Gaucher, entraîner des maladies mitochondriales comme le syndrome de Kearns-Sayre, entraîner des maladies peroxysomales comme le syndrome de Zellweger et même entraîner des maladies de surcharge de métaux, comme c'est le cas pour la maladie de Wilson (Rao et al., 2009).

Il existe plusieurs traitements selon le type de défaut dans la voie métabolique. La réduction de substrat par une diète spéciale ou par médication est l'un des traitements possibles. Ce

traitement est efficace lorsqu'un substrat provenant d'une source exogène n'est pas transformé en produit menant à une accumulation toxique de celui-ci et que l'on peut limiter l'ingestion de ce substrat. La réduction de substrat peut également être contrôlée par l'utilisation de médicaments limitant la production de molécules toxiques. Pour les patients ayant un déficit de vitamine servant de cofacteur aux enzymes et entraînant ainsi une EIM, un traitement efficace consiste à donner de manière exogène les vitamines qu'ils ne peuvent pas synthétiser eux-mêmes. Une autre possibilité est la thérapie d'enzyme de remplacement qui consiste à infuser des enzymes aux patients qui ne peuvent pas les synthétiser en quantité suffisante ou bien de manière fonctionnelle. Une autre approche est la thérapie par chaperons, efficace pour les patients ayant une activité enzymatique résiduelle qui est causée par le mauvais repliement de leurs enzymes. Les chaperons sont des protéines qui permettent le bon repliement des enzymes. Cette thérapie permet donc à certaines enzymes d'adopter la bonne conformation pour augmenter leur activité enzymatique (Gámez et al., 2017). Finalement, une approche plus radicale est la transplantation de cellules ou d'organes qui permet de produire les enzymes déficientes (Das, 2016).

1.1.3 Les types de mutations

Il y a plusieurs types de mutations qui peuvent affecter les gènes. Certaines mutations ont des conséquences plus graves chez l'individu tandis que d'autres n'ont aucun effet sur la santé (Jorde et al., 2004). Le code génétique est composé de nucléotides, soit des molécules composées d'un phosphate, d'un sucre et d'une base azotée. L'ADN possède quatre types de bases soit l'adénine (A), la cytosine (C), la thymine (T) et la guanine (G). Les bases A et T ainsi que les bases C et G sont toujours appariées sur les brins d'ADN afin de former la double hélice, des paires de bases. Il est à noter que lorsque l'ADN est transcrit en ARN, la thymine est remplacée par l'uracile (U). Des séquences de trois nucléotides permettent de former un acide aminé pour composer une protéine (Snustad & Simmons, 2016). Puisqu'il y a quatre types de bases et qu'un codon est formé de trois nucléotides, cela laisse 64 combinaisons possibles et il n'y a que 20 acides aminés. Cela signifie qu'il existe de la redondance dans le code génétique, ainsi certains acides aminés ont plusieurs combinaisons de codons. Parmi ces 64 combinaisons, il y a un codon d'initiation et trois codons d'arrêt (Jorde et al., 2004).

Un des types de mutations est la substitution de paires de bases, où un nucléotide est remplacé par un autre. Ce type de mutations peut avoir des répercussions si le codon codait pour un acide aminé et qu'il change pour un autre acide aminé. Toutefois, cette mutation peut également être silencieuse si le codon change, mais que l'acide aminé reste le même dû à la redondance du code génétique (Jorde et al., 2004). Lors de la substitution de paires de bases il peut y avoir des mutations faux-sens, ce qui cause le changement d'un acide aminé vers un autre ou bien des mutations non-sens qui causent l'apparition d'un codon d'arrêt et par le fait même l'arrêt de la synthèse de la protéine. Les mutations non-sens ont généralement un effet important sur la santé des personnes atteintes (Jorde et al., 2004).

Un autre type de mutations est l'insertion ou la délétion d'une ou plusieurs paires de bases. Cela peut avoir comme conséquence de synthétiser trop ou pas assez d'acide aminé, causant souvent un dysfonctionnement de la protéine en question. Il peut également y avoir comme conséquence un changement de cadre de lecture; lors de la lecture des trois nucléotides formant le codon il y aura un décalage, formant ainsi une séquence erronée d'acides aminés. Les insertions ou les délétions de nucléotides peuvent mener à la formation d'un codon d'arrêt prématuré. Cela fait en sorte que la protéine n'est pas formée entièrement et peut mener à une perte de sa fonction (Jorde et al., 2004). Des exemples de différents types de mutations sont présentés à la Figure 1.

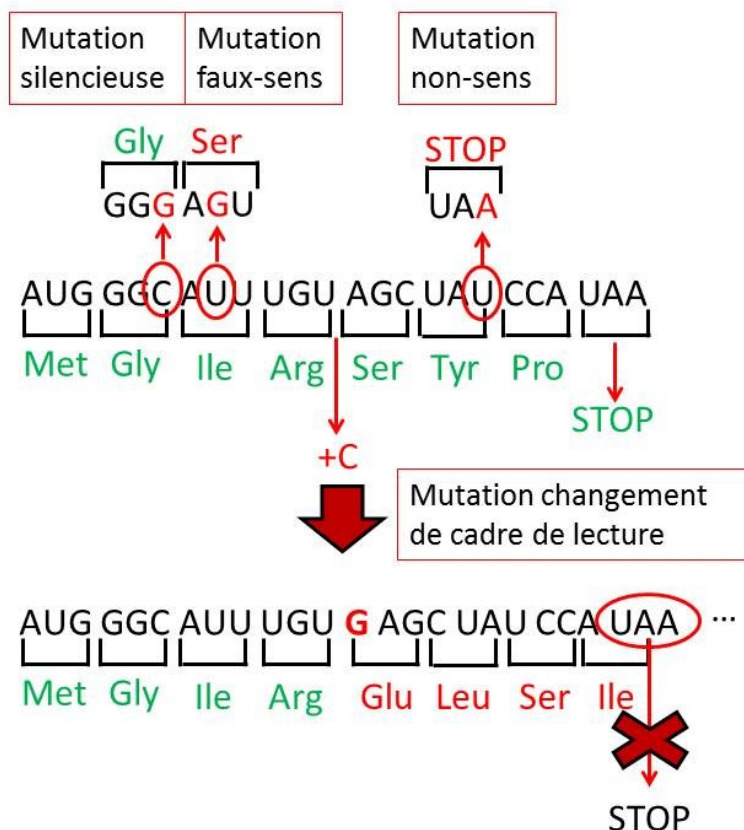


Figure 1. Exemples de mutations au niveau des gènes pouvant modifier la séquence d'acides aminés.

Plusieurs autres types de mutations peuvent survenir dans l'ADN, mais elles ne seront pas abordées dans cet ouvrage.

1.1.4 Mode de transmission des gènes

Il existe plusieurs types de transmission de gènes, soit l'hérédité mendélienne qui fait référence à une condition dépendante d'un seul gène, donc monogénique comme c'est le cas pour les EIM (Snustad & Simmons, 2016). Il y a également l'hérédité mitochondriale lorsque les gènes proviennent de l'ADN mitochondrial (ADN bactérien) et non de l'ADN nucléaire (ADN humain). Cette transmission est exclusivement faite de la mère vers l'enfant (Picard et al., 2016). Enfin, il y a l'hérédité multifactorielle qui dépend d'un ensemble de gènes, mais qui dépend également de facteurs environnementaux (Shamriz et al., 2016). Lorsque l'on fait référence à un phénotype, il s'agit de ce qui est exprimé par les gènes, ce

que l'on peut observer chez l'individu sans connaître l'ensemble de son bagage génétique, soit son génotype (Snustad & Simmons, 2016).

En se concentrant sur les maladies mendéliennes, la transmission de gènes peut se faire de manière autosomique dominante, la présence d'une seule copie du gène muté est suffisante pour causer une maladie génétique (Snustad & Simmons, 2016). Ainsi, un parent atteint d'une maladie génétique dominante a une probabilité de 50% de transmettre ou non sa condition à son enfant. Un exemple de transmission dominante est présenté à la Figure 2.

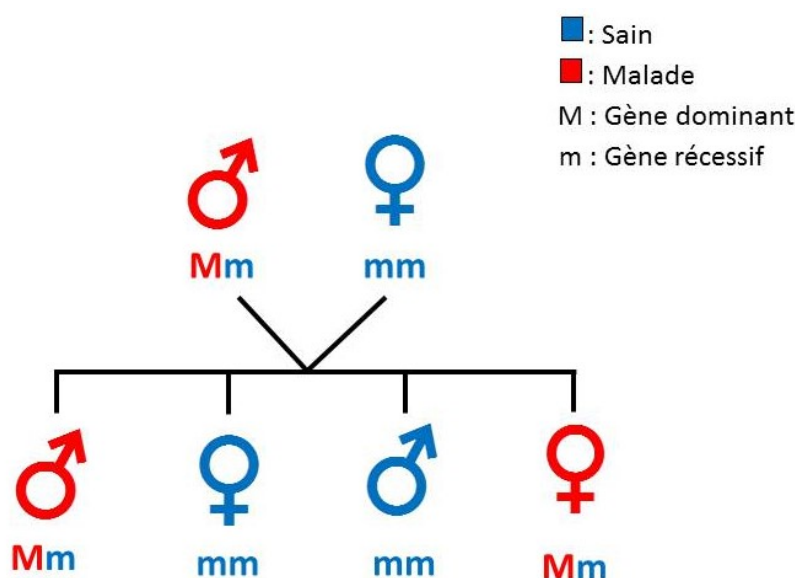


Figure 2. Exemple de transmission d'une maladie héréditaire dominante.

La transmission de gènes peut également être autosomique récessive, la présence de deux copies mutées du gène chez un individu sont nécessaires pour l'apparition de la condition (Snustad & Simmons, 2016). Ainsi, lorsqu'un parent est atteint d'une maladie génétique récessive et que l'autre parent a un génotype sain, cela n'est pas suffisant pour transmettre la condition. Les descendants seront des porteurs sains de la mutation.

Dans le cas où les deux parents ont chacun une copie du gène muté, le risque de transmettre à la descendance les deux copies mutées du gène est de 25%. Deux exemples de transmissions récessives sont présentés à la Figure 3.

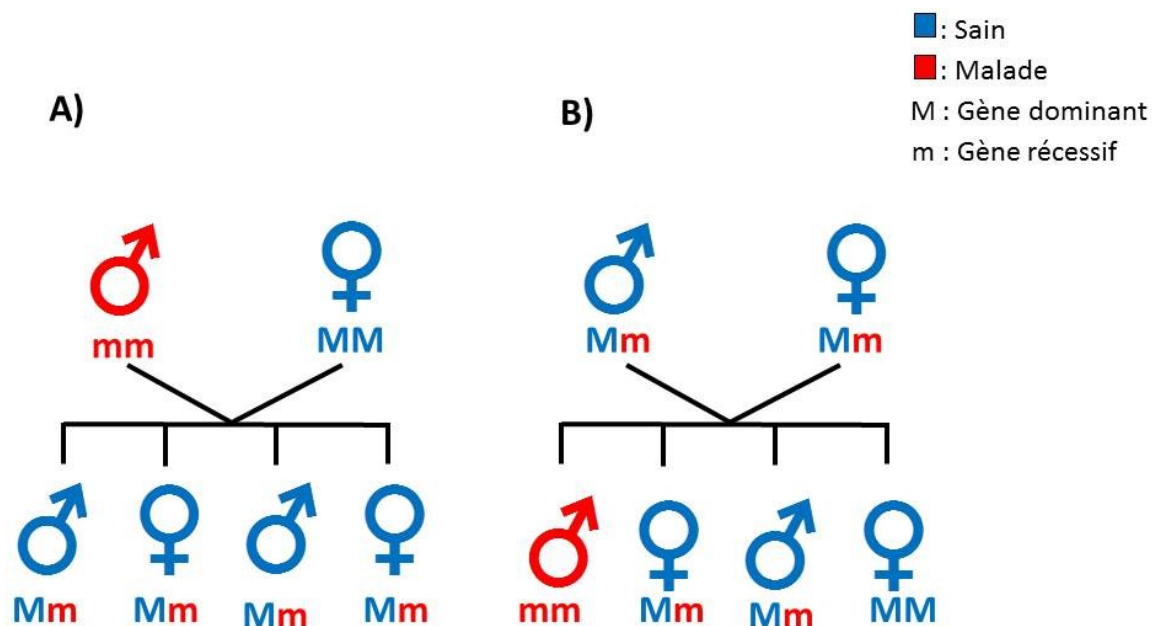


Figure 3. Exemples de transmission d'une maladie héréditaire récessive: A) un des deux parents est atteint de la maladie récessive; B) les deux parents sont porteurs de la maladie récessive.

La transmission de maladies mendélienne peut aussi être liée à l' X , le gène muté se situe donc sur le chromosome X . Les femmes possèdent deux chromosomes X , tandis que les hommes possèdent un chromosome Y et seulement un X . La transmission liée à l' X implique que les femmes peuvent être porteuses de mutations sur un de leur chromosome X , sans nécessairement exprimer des signes de maladies, tandis que les hommes atteints d'une mutation sur leur chromosome X seront affectés par la condition (Snustad & Simmons, 2016). Lorsqu'une femme possède un chromosome X muté, celle-ci a 50% de probabilité de le transmettre à sa descendance. Dans le cas où elle donne naissance à une fille, la probabilité qu'elle soit porteuse du chromosome muté est de 50%, dans le cas où elle donne naissance à un garçon celui-ci a une probabilité de 50% d'être atteint par la condition. Lorsqu'un homme possède une mutation sur son chromosome X , donc atteint d'une condition, il donnera obligatoirement son chromosome X muté dans le cas de la naissance d'une fille, celle-ci sera porteuse de la maladie, dans le cas de la naissance d'un garçon celui-ci n'aura pas la mutation dans son génotype étant donné qu'il aura reçu le chromosome Y de son père. Deux exemples de transmission liée au chromosome X sont présentés à la Figure 4.

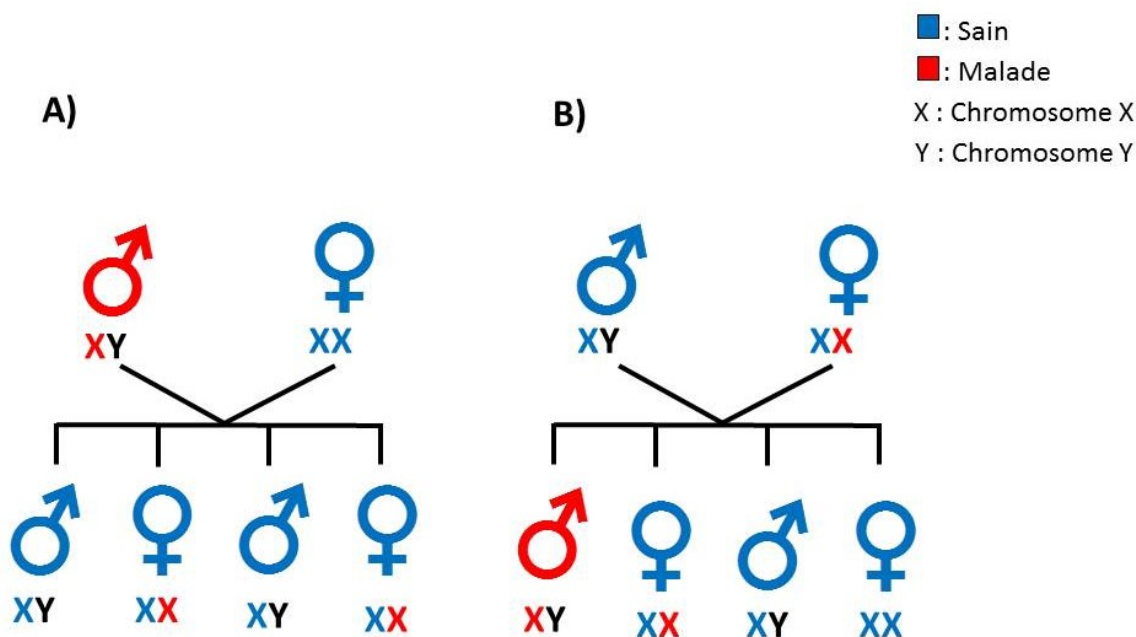


Figure 4. Exemples de transmission d'une maladie héréditaire liée au chromosome X: A) le père est atteint de la maladie; B) la mère est porteuse de la maladie.

1.1.5 Variabilité génétique

Même en suivant les principes de l'hérédité, il peut arriver qu'un individu ne présente pas le phénotype relié à son génotype. Cela a été identifié dans la littérature comme de la pénétrance incomplète (Snustad & Simmons, 2016). Un exemple de pénétrance incomplète est facilement observable dans le cas de la polydactylie, une mutation dominante qui se caractérise par la présence de plus de dix doigts ou de dix orteils. En théorie, une personne ayant cette mutation dans son génotype devrait exprimer la condition, mais en pratique il peut arriver que cet individu ait un phénotype normal, tandis que le reste de la famille est affecté par la condition dominante (Snustad & Simmons, 2016). Un individu peut aussi être affecté par une condition génétique à différents niveaux d'expressivité. Des personnes ayant la même mutation peuvent donc avoir des répercussions variables sur leur santé (Snustad & Simmons, 2016).

Pour les maladies liées au chromosome X, l'expressivité d'une femme à l'autre peut grandement varier. Comme dit précédemment, les femmes possèdent deux chromosomes X, il y a donc un phénomène d'égalisation de produits qui résulte de l'inactivation d'un des deux chromosomes X. Cette inactivation se produit à un stade précoce du développement

embryonnaire. Chacune des cellules du corps de la femme inactive un chromosome X de manière aléatoire et définitive (Jorde al., 2004). La femme possédant un chromosome X muté peut l'inactiver, mais il est aussi possible qu'elle inactive le chromosome X sain. Deux exemples sont présentés à la Figure 5. Donc, pour une transmission liée à l'X, une femme peut être aussi sévèrement atteinte qu'un homme ou bien n'avoir aucun symptôme. (Germain, 2000).

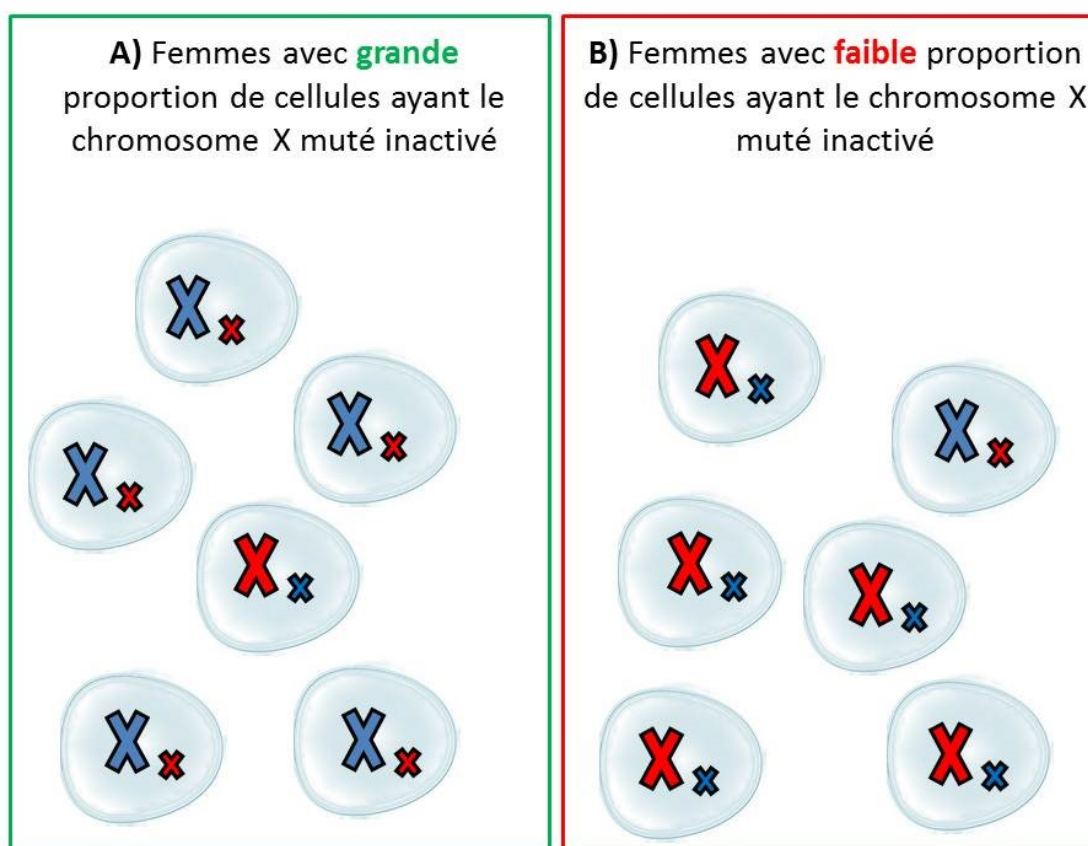


Figure 5. Exemples d'inactivation du chromosome X muté: A) femme avec une inactivation du chromosome X muté majoritaire dans ses cellules, donc moins atteinte par la maladie liée au chromosome X; B) femme avec une inactivation du chromosome X muté minoritaire dans ses cellules, donc plus atteinte par la maladie liée au chromosome X.

Il peut aussi arriver qu'un individu soit touché par une mutation *de novo*. La particularité de ces mutations est qu'elles ne sont pas présentes dans le génome des parents (Jorde et al., 2004). Les mutations *de novo* peuvent être causées par la mutation des gènes parentaux lors du développement de l'embryon. De cette manière, le risque pour les parents

d'avoir un deuxième enfant atteint de la même condition est très faible, soit égal à celui de la population en général. Ces mutations peuvent également être causées par des mutations dans les cellules germinales (gamètes) des parents, donc le parent en question n'est pas affecté par cette mutation, mais pour l'enfant cette mutation affectera l'ensemble des cellules somatiques, causant un plus grand impact (Jorde et al., 2004). Pour ces parents, le risque d'avoir un deuxième enfant atteint est plus élevé que pour la population en général (Veltman & Brunner, 2012).

1.2 Les maladies lysosomales

1.2.1 Aspects généraux

Les lysosomes sont des organites ayant comme fonction de dégrader des molécules exogènes ou des molécules endogènes devenues obsolètes. Chez les mammifères, les lysosomes sont des organites présents dans toutes les cellules à l'exception des globules rouges (Mehta et al., 2006). Ils sont composés de 60 types d'hydrolases comme des lipases, des protéases et des glycosidases, leur permettant de dégrader différents types de molécules (Xu & Ren, 2015). Le pH dans les lysosomes est maintenu à environ 5. Dans le but de le conserver dans un milieu acide, ils sont pourvus de pompes à protons sur leur membrane qui permettent de transporter les protons du cytosol vers l'intérieur des lysosomes et cela, de manière active, donc ATP dépendante (Cooper & Hausman, 2007).

1.2.2 Fonction des lysosomes

Pour se rendre vers les lysosomes où s'effectuera la dégradation, les molécules intracellulaires ou extracellulaires ont des voies spécifiques. La phagocytose est la voie privilégiée pour dégrader les substances de taille importante, notamment les bactéries, les débris cellulaires, etc. Lorsque ces substances se lient à la membrane cellulaire, celles-ci sont absorbées dans la cellule en formant une vésicule appelée le phagosome. Le phagosome se fusionnera avec un lysosome afin que le contenu de la vésicule soit digéré et les substances indigestibles soient expulsées par exocytose (Marieb & Hoehn, 2010).

Certaines macromolécules et particules extracellulaires sont reconnues par des récepteurs spécifiques à la surface de la membrane plasmique. Dans ce cas, la voie d'endocytose sera

enclenchée et les molécules seront d'abord encerclées par la membrane plasmique, puis elles seront internalisées dans la cellule, formant une vésicule qui se détache de la membrane plasmique pour se rendre vers les lysosomes (Cooper & Hausman, 2007).

Pour absorber des fluides de l'extérieur de la cellule, ce sera la voie de la pinocytose qui sera amorcée. La membrane plasmique englobera une gouttelette de liquide qui sera intégrée dans la cellule (Marieb & Hoehn, 2010). Cette gouttelette formera une vésicule qui se détachera de la membrane plasmique pour se rendre vers les endosomes, puis vers les lysosomes. Cette voie permet d'absorber de manière non spécifique des liquides contenant de petites molécules (Cooper & Hausman, 2007).

Finalement dans des situations où les nutriments venaient à manquer, donc en situation de stress, les cellules peuvent dégrader des protéines ou organites non essentiels afin de les réutiliser, cela est appelé l'autophagie. Des vésicules, les autophagosomes, sont formées et se fusionnent avec les lysosomes afin de dégrader le contenu de ces vésicules (Cooper & Hausman, 2007).

Dans le cas où une enzyme serait dysfonctionnelle, il y aurait accumulation de la molécule substrat dans le lysosome étant donné que cette molécule ne pourra pas être dégradée. C'est ce que l'on appelle une maladie de surcharge lysosomale.

1.2.3 Formation des lysosomes

La formation des lysosomes commence dans le réticulum endoplasmique. D'abord, il y a production des protéines contenues dans les lysosomes telles que les hydrolases. Cette synthèse est effectuée par les ribosomes qui traduisent l'information de l'ARN messager. La conformation tridimensionnelle des protéines sera définie au sein du réticulum endoplasmique à l'aide de chaperons qui aideront les protéines à se replier correctement (Cooper & Hausman, 2007).

Par la suite, les protéines seront transportées vers l'appareil de Golgi par des vésicules. Dans l'appareil de Golgi, il y aura une phosphorylation des oligosaccharides préalablement ajoutés

dans le réticulum endoplasmique, cela formera les résidus mannose-6-phosphate (M6P) qui servent à identifier les protéines qui doivent être transportées vers les lysosomes. Les protéines ayant des résidus M6P seront reconnues par les récepteurs M6P et seront directement transportées vers les endosomes, puis fusionnées avec les lysosomes (Cooper & Hausman, 2007).

1.2.4 Pathologies associées aux lysosomes

À ce jour, il est estimé que les maladies de surcharge lysosomales englobent environ 70 différentes erreurs innées du métabolisme et que ces dernières affectent entre 1/500 et 1/7500 individus (Lloyd-Evans & Haslett, 2016). Les maladies de surcharge lysosomales ont été réparties en différentes classes selon le type de molécules accumulées dans l'organisme, soit les mucopolysaccharidoses, les sphingolipidoses, les glycoprotéinoses et une dernière classe regroupant les maladies lysosomales diverses (Cox & Cachón González, 2012; Parenti et al., 2015).

Les signes cliniques sont très diversifiés, d'abord parce qu'il y a plusieurs types de maladies de surcharge lysosomales, ainsi différentes enzymes peuvent être déficientes et provoquer l'accumulation de différents types de molécules dans le corps. Ensuite, au sein d'une même maladie, les signes et les symptômes des patients peuvent atteindre différents systèmes, notamment le système cardiovasculaire, nerveux, rénal, etc. (Futerman & van Meer, 2004; El-Abassi et al., 2014). Une des particularités des maladies de surcharge lysosomales est que la corrélation entre le génotype du patient et son phénotype n'est pas toujours établie. Il est donc parfois difficile de prédire la sévérité et la progression de la maladie pour l'individu atteint (Mehta et al., 2006). Puisque les signes et les symptômes des patients ne sont pas spécifiques aux maladies lysosomales, il est souvent difficile de poser un diagnostic rapidement et de façon définitive. En raison du délai à obtenir un diagnostic précis et définitif, il est fort probable que le nombre de personnes atteintes de maladies lysosomales soit sous-estimé (Ranieri et al., 2016).

1.3 La maladie de Fabry

1.3.1 Description de la maladie de Fabry

La maladie de Fabry (OMIM no. 301500) est une maladie de surcharge lysosomale classifiée comme étant une sphingolipidose. La maladie de Fabry est liée au chromosome X. Ainsi dans la majorité des cas, les hommes atteints de la maladie de Fabry développent des symptômes plus sévères que les femmes, mais il est également possible que les femmes porteuses de la mutation soient atteintes au même niveau que les hommes (Abaoui et al., 2016).

L'incidence à travers le monde est évaluée entre 1/40 000 et 1/117 000, mais cette incidence est sous-estimée comme la plupart des maladies lysosomales. Ceci est dû à la grande diversité des signes et des symptômes entraînant un important retard à poser un diagnostic (Mehta et al., 2004; Desnick et al., 2005; Ranieri et al., 2016). À Taipei, Taïwan, un dépistage chez les nouveau-nés masculins a été mené et une incidence de 1/1600 a été trouvée pour une variante cardiaque de la maladie (IVS4 + 919G>A), ce qui tend à démontrer que la maladie de Fabry est plus fréquente que l'on ne le croit (Lin et al., 2009; Auray-Blais et al., 2015).

Cette maladie est causée par une mutation au niveau du gène *GLA* causant le déficit de l'enzyme alpha-galactosidase A (α -Gal A, EC 3.2.1.22). Il existe plus de 800 mutations pouvant entraîner la maladie de Fabry (HGMD, 2017). La majorité des patients Fabry ont des mutations faux-sens soit dans environ 60% des cas (Benjamin et al., 2016). Des mutations non-sens, des délétions dans le gène codant pour l'enzyme ou de décalage de cadre de lecture sont aussi possibles (Ranieri et al. 2016).

Le déficit de l' α -Gal A cause l'accumulation de glycosphingolipides tels que le globotriaosylcéramide (Gb₃) (Kitagawa et al., 2005; Young et al., 2005), le globotriaosylsphingosine (lyso-Gb₃) (Aerts et al., 2008; Auray-Blais et al., 2010) et le galabiosylcéramide (Ga₂) (Mills et al., 2005; Boutin & Auray-Blais, 2015). Ces molécules s'accumulent particulièrement dans les lysosomes de tous les tissus, mais également dans d'autres compartiments cellulaires tels que le noyau et le réticulum endoplasmique et aussi au niveau de l'endothélium vasculaire et les liquides biologiques, tels le plasma et l'urine.

Les mécanismes par lesquels s'accumulent et s'entreposent ces molécules dans les cellules ne sont pas encore totalement compris, tout comme l'impact multisystémique causé par l'accumulation des glycosphingolipides (Askari et al., 2007).

1.3.2 Signes et symptômes

Chez les patients atteints de la maladie de Fabry, les signes et les symptômes apparaissent souvent dès le jeune âge, autour de 6 à 8 ans pour les garçons et 9 ans pour les filles (Ranieri et al., 2016). Les premiers troubles de santé sont souvent des douleurs insupportables aux mains et aux pieds, aussi appelés de l'acroparesthésie (Desnick & Brady, 2004), une transpiration insuffisante ou absente, soit de l'hypohidrose ou de l'anhydrose, ce qui les rend très inconfortables lorsqu'ils pratiquent des activités physiques, l'apparition de lésions à la peau appelées des angiokératomes ainsi que des troubles gastro-intestinaux (Bouwman et al., 2011). Ces jeunes enfants développeront souvent des troubles psychosociaux dus à l'impact de la maladie sur leur qualité de vie. Tous les aspects de la vie quotidienne des patients sont affectés par la maladie de Fabry que ce soit par la douleur, par une limitation physique, par le manque d'énergie, par l'aspect psychologique (Mehta et al., 2006).

Afin d'améliorer la qualité de vie des patients, le diagnostic précoce de la maladie de Fabry est le plus grand allié pour le moment. En effet, si le diagnostic est posé rapidement, cela permet d'apporter un traitement adéquat et une meilleure prise en charge et suivi de la santé des patients et finalement d'assurer un support pour le patient et ses proches dans le cadre d'un conseil génétique approprié. Lorsqu'il y a un antécédent de la maladie de Fabry dans la famille, les nouveaux patients sont plus rapidement repérés grâce à un dépistage en cascade. Pour la majorité des patients où il n'y a jamais eu de cas suspecté dans la famille, le diagnostic est souvent retardé par des diagnostics erronés ou non concluants étant donné la grande variabilité des signes et des symptômes que peuvent avoir les patients. On estime qu'en moyenne, chez les patients atteints de la maladie de Fabry, les hommes ont un délai de 13.7 ans et les femmes de 16.3 ans depuis le début des symptômes jusqu'au diagnostic final de la maladie (Mehta et al., 2004).

1.3.2.1 Troubles cardiovasculaires

Les manifestations cardiaques sont fréquemment rencontrées chez les patients atteints de la maladie de Fabry, soit environ 69% des hommes et 65% des femmes (Mehta et al., 2004). Ces symptômes évoluent différemment d'un patient à l'autre. Les signes les plus fréquents sont l'apparition de dyspnée, de douleurs à la poitrine (angine de poitrine), des palpitations cardiaques ainsi que des syncopes (Mehta et al., 2006).

L'hypertrophie ventriculaire gauche peut être un des troubles progressifs rencontrés (Kampmann et al., 2002). Dans plusieurs cas, il est possible de mesurer l'augmentation anormale du septum du cœur au détriment du ventricule gauche soit par échographie ou par l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Ceci est causé par le remplacement des tissus normaux par de la cicatrisation appelé de la fibrose (Germain, 2010). La maladie de Fabry non diagnostiquée est responsable de 1 à 4% des cas d'hypertrophie ventriculaire gauche chez les hommes (Lin et al., 2009). Chez les patients atteints de la maladie de Fabry, environ 46% des hommes et 28% des femmes souffriront d'hypertrophie ventriculaire gauche. En moyenne, l'âge à laquelle ce symptôme apparaîtra est vers 38 ans chez les hommes et 55 ans chez les femmes (Mehta et al., 2004).

D'autres troubles cardiovasculaires peuvent survenir comme de l'arythmie (Germain, 2010) provoquée soit par des problèmes d'excitabilité provenant du nœud sinusal envoyant des impulsions désordonnées au cœur ou soit par des troubles de conduction où la transmission des signaux des oreillettes vers les ventricules est compromise (Marieb & Hoehn, 2013). La fonction compromise du lit vasculaire coronaire cause parfois un manque d'oxygène au cœur provoquant ainsi des ischémies et des infarctus du myocarde. Des troubles de la valve mitrale ont été rapportés chez des patients Fabry. Les troubles cardiovasculaires font partie de ceux causant le plus de morbidité et de mortalité (Mehta et al., 2004).

À Taipei, Taiwan, il existe une variante cardiaque de la maladie de Fabry, soit celle où les patients atteints ont la mutation IVS4+919G→A. Parmi tous les patients Fabry dépistés à Taipei, cette mutation a été retrouvée chez 82% des patients atteints de la maladie de Fabry. Les patients atteints de cette mutation souffriront uniquement de troubles cardiovasculaires

et n'auront pas d'autres signes et symptômes de la maladie (Lin et al., 2009; Auray-Blais et al., 2017).

1.3.2.2 Troubles rénaux

Les troubles rénaux sont également fréquents et progressifs chez les patients atteints de la maladie de Fabry. Au cours de la vie du patient, les reins subiront des dommages causés par les dépôts de molécules indésirables. Dans la plupart des cas, lorsque les patients atteindront l'âge de 20 à 30 ans, il y aura un début de protéinurie, soit la présence de protéines dans l'urine. Afin de ne pas perdre les protéines dans l'urine, les reins assurent habituellement un barrage, mais lorsqu'ils sont trop endommagés cette fonction est défaillante (Nuñez et al., 2010). Au cours de la vie d'un patient atteint d'une forme classique de la maladie de Fabry, il y aura une détérioration de plusieurs néphrons (Germain, 2010), soit l'unité structurale et fonctionnelle du rein (Marieb & Hoehn, 2013), ce qui causera une diminution du débit de filtration glomérulaire et une augmentation de l'urée dans le sang. Ainsi, une majorité des patients ayant des troubles rénaux auront besoin de dialyse au cours de leur vie pouvant mener à une transplantation rénale (Germain, 2010).

1.3.2.3 Troubles neurologiques

Un des signes qui se manifestent le plus tôt chez un patient atteint de la maladie de Fabry est l'acroparesthésie qui se définit comme une douleur aiguë, insupportable et handicapante au niveau des mains et des pieds (MacDermot et al., 2001). Ces épisodes de douleur se manifestent sous forme de crise pouvant durer quelques minutes ou sous forme de douleur chronique pouvant durer quelques jours (Mehta et al., 2006). Cette douleur neuropathique est provoquée par des dommages aux nerfs périphériques qui affectent de manière importante les fibres nociceptives. L'acroparesthésie peut être provoquée par des dommages aux fibres A δ myélinisées qui permettent l'acheminement des informations mécaniques et thermiques ou bien par des dommages aux fibres C amyéliniques qui transmettent la douleur (Hovaguimian & Gibbons, 2011). L'acroparesthésie est l'un des symptômes les plus courants de la maladie de Fabry. Les épisodes de douleur sont souvent précédés par un changement important de température, d'un effort soutenu ou bien d'un moment de stress (Schiffmann & Ries, 2016).

La plupart des patients souffrant d'acroparesthésie ont également un problème au niveau de la sudation. Un déficit dans les glandes sudoripares (Mehta et al., 2006) peut causer de l'anhidrose qui est l'incapacité totale de sécréter de la sueur ou de l'hypohidrose qui est l'incapacité à sécréter la quantité suffisante de sueur pour permettre au patient de régulariser sa température corporelle (Germain, 2010). Les patients atteints d'hypohidrose sont plutôt limités dans leurs activités quotidiennes, ceux-ci ne peuvent pas faire autant d'exercice qu'ils le voudraient (Schiffmann & Ries, 2016).

Une des conséquences à long terme de l'atteinte neurologique des patients Fabry est la prédisposition à subir un accident vasculaire-cérébral (AVC). Effectivement, ces patients auront une probabilité d'AVC allant de 5.5 à 12.2 fois plus élevée que la population en général (Schiffmann & Ries, 2016). En moyenne, chez les patients atteints de la maladie de Fabry, le premier AVC survient à l'âge de 39 ans chez les hommes et de 46 ans chez les femmes (Germain, 2010).

1.3.2.4 Troubles dermatologiques

Un des premiers indices visuels que présente un jeune patient atteint de la maladie de Fabry est l'apparition d'angiokératomes, soit des lésions à la peau. Ces petites papules ont une couleur allant du rouge au violet et peuvent apparaître seules ou bien en groupe. Généralement les angiokératomes se concentrent sur les fesses, l'aîne, la région ombilicale, les cuisses et parfois au niveau des muqueuses comme celles de la bouche (Mehta et al., 2006).

Ces lésions sont causées par la dilatation de vaisseaux sanguins à la surface du derme (Mehta et al., 2006) due à l'accumulation de dommages aux cellules endothéliales de la peau (Germain, 2010). Les premières apparitions varient entre l'âge de 5 et 15 ans et la quantité ainsi que la grosseur des angiokératomes augmentent généralement avec l'âge du patient. Chez les patients atteints de la maladie de Fabry, ces troubles dermatologiques affecteront environ 83% des hommes et 80% des femmes (Germain, 2010).

Le développement d'angiokératomes n'est pas spécifique à la maladie de Fabry, mais permet de guider vers le bon diagnostic. En effet, d'autres maladies lysosomales comme la bêta-mannosidose, la fucosidose, la sialidose, le déficit de la β -galactosidase et la maladie de Schindler provoquent des lésions similaires. Il y a même eu apparition d'angiokératomes dans un cas d'un lymphome de Hodgkin (Schiffmann & Ries, 2016).

1.3.2.5 Troubles ophtalmologiques

La maladie de Fabry a également des répercussions au niveau ophtalmologique sans toutefois affecter la vision des patients (Kalkum et al., 2016). Étant donné que ces symptômes apparaissent tôt dans la vie des patients et qu'ils sont observables physiquement, ils peuvent s'avérer utiles pour le dépistage (Michaud & Auray-Blais, 2012; Michaud, 2013). Il a été estimé que chez les enfants, il est possible de retrouver au moins une caractéristique ophtalmologique chez 54.5% des filles et 47.3% des garçons dans leur première décennie (Kalkum et al., 2016). De toutes les caractéristiques oculaires retrouvées chez les patients, la cornée verticillée est le symptôme le plus souvent rencontré, soit chez 74% des hommes et 66% des femmes atteints de la maladie de Fabry (Van der Tol et al., 2016). Chez plusieurs patients, il y a également présence de tortuosités au niveau de la paupière ou bien d'opacité cornéenne (Michaud, 2013).

1.3.2.6 Troubles gastro-intestinaux

Les troubles gastro-intestinaux comme des diarrhées chroniques et des douleurs abdominales sont souvent rapportés et nuisent sévèrement à la qualité de vie des patients atteints de la maladie de Fabry (Mehta et al., 2006). Il a été établi que 60% des patients y sont confrontés (Keshav, 2006).

1.3.2.7 Troubles psychologiques

Deux des aspects principaux qui portent atteinte à la qualité de vie des patients sont d'ordre physique et mental. Les patients éprouvent une qualité de vie réduite au niveau du fonctionnement physique, du rôle physique, de la douleur corporelle, de la santé générale, de la vitalité, du fonctionnement social, du rôle émotionnel et de la santé mentale. Des symptômes de fatigue, d'intolérance à l'effort physique, de dépression ou d'anxiété sont souvent observés chez les patients (MacDermot et al., 2001; Wang et al., 2007). Le

développement social des patients est compromis par leur qualité de vie réduite (Bouwman et al., 2011). Le risque de dépression est plus important chez les patients atteints de la maladie de Fabry, avec une prévalence de 46%. Les dépressions cliniques sévères quant à elles atteignent 28%. Il y a une corrélation entre le niveau de dépression chez les patients et la douleur ressentie (Cole et al., 2007; Crosbie et al., 2009).

1.3.3 Dépistage et diagnostic

Le diagnostic de la maladie de Fabry est un véritable enjeu pour les médecins. Les symptômes étant très variables, ce qui mène souvent à un diagnostic erroné ou non concluant. Dans certaines populations, des dépistages populationnels ont été effectués pour connaître la véritable prévalence de la maladie et pour prendre en charge les patients de manière plus adéquate (Lin et al., 2009). Une autre forme de dépistage est de cibler les patients présentant un risque élevé d'être atteints de la maladie de Fabry. De fait, le dépistage à haut-risque consiste à évaluer les patients présentant des atteintes pouvant s'apparenter aux symptômes les plus fréquents de la maladie de Fabry, mais qui n'ont aucun diagnostic (Linthorst et al., 2010; Schiffmann et al., 2016).

Un modèle de dépistage à haut-risque a été proposé, basé sur les symptômes cardiaques, rénaux ou neurologiques, dont la cause restait inconnue. Le but visé était de permettre un dépistage plus ciblé et fournir un diagnostic plus rapide pour les patients atteints de la maladie de Fabry (Auray-Blais et al., 2009). Il a également été possible de dépister plusieurs patients Fabry, simplement en repérant des anomalies ophtalmologiques au cours d'examen de routine (Michaud, 2013). Une fois les patients ciblés avec une anomalie de l'œil, un échantillon d'urine a été recueilli pour l'analyse par spectrométrie de masse en tandem des biomarqueurs comme le Gb₃ et le lyso-Gb₃ normalisés par la créatinine. Par la suite, pour les hommes ayant des résultats anormaux, un test d'activité enzymatique était effectué et si ce test s'avérait aussi anormal un test de mutation génétique confirmait ou non le diagnostic. En ce qui concerne les femmes, si l'échantillon d'urine était anormal, celles-ci étaient directement dirigées vers le test de mutation génétique. De fait, contrairement aux hommes, les femmes atteintes de la maladie de Fabry peuvent avoir une activité enzymatique normale

et ne pas être repérées par un test enzymatique (Auray-Blais et al., 2009; Linthorst et al., 2010; Nowak et al., 2017).

Une fois la maladie de Fabry diagnostiquée, celle-ci doit être prise en charge de manière adéquate (Rozenfeld, 2009). Le diagnostic permet également de trouver d'autres cas de maladie de Fabry dans la famille du patient et de les prendre en charge plus rapidement et de fournir un conseil génétique pour le futur. Il est possible de détecter la maladie de Fabry pendant une grossesse par amniocentèse, pour les parents qui ne veulent pas transmettre la maladie. Autrement, il est possible de faire un test de dépistage lorsque l'enfant grandira pour mieux le prendre en charge (Rozenfeld, 2009).

1.3.4 Thérapie d'enzyme de remplacement

Un des traitements les plus utilisés est la thérapie d'enzyme de remplacement (TER). Le principe de ce traitement consiste à infuser par voie intraveineuse l'enzyme déficitaire à toutes les deux semaines. Il existe deux enzymes recombinantes soit l'agalsidase alfa (Replagal®, Shire) ou agalsidase beta (Fabrazyme®, Sanofi Genzyme) qui sont infusées à des concentrations de 0.2 mg/kg de poids et 1 mg/kg de poids, respectivement (Lee et al., 2003; Alipourfetrati et al., 2015; Oder et al., 2016). L'algalsidase alfa est produite à partir de lignées cellulaires humaines par l'activation de gènes, mais n'est toutefois pas approuvée aux États-Unis par la Food and Drug Administration (FDA). L'algalsidase beta quant à elle, est produite à partir de cellules provenant d'ovaires de hamster (Alipourfetrati et al., 2015). Une des différences connues entre les deux enzymes recombinantes est que l'algalsidase beta contient une plus grande quantité de mannose-6-phosphate, permettant l'absorption cellulaire plus rapidement. Ce traitement, peu importe l'enzyme choisie, est très coûteux soit environ 250 000\$ canadien par année pour un adulte moyen (Clarke, 2007).

En 2009, plusieurs patients ayant des infusions d'algalsidase beta ont été obligés de changer leur traitement dû à une contamination virale du produit qui a mené à une pénurie. Les patients se sont vus diminuer la concentration d'enzyme utilisée ou être redirigés vers l'algalsidase alfa (Oder et al., 2016; Pisani et al., 2016). Ceci a permis de confirmer que le

changement d'un type d'enzymes à l'autre ne procure pas d'effets secondaires sur une courte période (Pisani et al., 2016).

Il a été démontré que la TER permet de réduire la progression et la sévérité de la maladie (Eng et al., 2001). Une fois les patients sous traitement, une réduction de la quantité de Gb₃ et de lyso-Gb₃ est retrouvée dans l'urine et le plasma des patients. Il y a également un soulagement des symptômes des patients, dont les effets les plus rapides sont un soulagement de la douleur et des troubles gastro-intestinaux. À plus long terme, il est possible de voir une stabilisation des atteintes rénale et cardiaque. Cependant, les dommages déjà causés par la maladie demeurent irréversibles (Clarke, 2007).

La TER a plusieurs effets bénéfiques sur les patients, mais en contrepartie peut aussi mener à des inconvénients. Plusieurs cas de développement d'anticorps contre la TER ont été rapportés (Deegan, 2012). Ces anticorps nuisent à l'efficacité du traitement et peuvent être néfastes pour la santé des patients (Smid et al., 2013; Deegan, 2012). Au Canada, les patients Fabry qui peuvent recevoir la TER doivent respecter certains critères établis par le Canadian Fabry Disease Initiative (CFDI) (Sirrs et al., 2017; Sirrs et al., 2014), soit un projet de recherche qui vise, entre autres, à collecter des informations sur l'efficacité de la TER pour prévenir de graves complications médicales, de comparer les deux enzymes disponibles pour le traitement soit l'algalsidase alfa et l'algalsidase beta et d'évaluer l'incidence de la maladie, de même que la progression de celle-ci pour les patients n'ayant pas accès à la thérapie. La première cohorte est composée de patients qui étaient sous TER avant la création du projet du CFDI et qui poursuivent le même traitement depuis. La deuxième cohorte est composée de patients qui n'avaient pas de traitement par TER avant la création du projet du CFDI et qui rencontrent les critères pour l'accès à la TER. Pour cette cohorte le traitement était randomisé au départ selon les deux thérapies disponibles jusqu'à la pénurie de l'agalsidase beta (Sirrs et al., 2010). La troisième cohorte est composée de patients n'ayant pas de TER, soit que ceux-ci ne voulaient pas de TER, donc qu'ils n'ont pas consenti à la recevoir ou qu'ils ne répondent pas aux critères (Sirrs et al., 2010).

1.3.5 Thérapie génique

La thérapie génique soulève un grand espoir pour plusieurs maladies génétiques. Au Canada, le premier essai clinique mondial chez l'être humain a été approuvé pour la maladie de Fabry (M.A.G.I.C. Clinic, 2017; CTV News, 2017). Le principe de ce traitement est de régler le problème à la base, soit en réparant le gène défectueux pour que les patients puissent eux-mêmes générer l' α -galactosidase A déficiente. Pour y arriver, des vecteurs de lentivirus ont été mis au point avec le gène fonctionnel, pour corriger les cellules souches hématopoïétiques (Huang et al., 2017; M.A.G.I.C. Clinic, 2017).

Les tests précliniques du vecteur de lentivirus employé démontraient une efficacité et une sécurité d'utilisation dans des modèles ex-vivo et chez les souris Fabry. Une augmentation de l'activité de l' α -galactosidase A et une réduction des lipides retrouvés ont été constatées dans plusieurs tissus, 6 mois après l'insertion du vecteur chez les souris Fabry. Les tests ont même permis de voir une augmentation plus importante de l'enzyme dans les cellules souches hématopoïétiques chez les patients ayant le vecteur que chez les contrôles (Huang et al., 2017).

1.3.6 Autres thérapies

La thérapie par chaperons est une autre thérapie qui vient de recevoir l'approbation de Santé Canada (Stockhouse, 2017). Le déficit de l'enzyme α -galactosidase A peut aussi être causé par le mauvais repliement de la protéine. Cela peut se produire lorsque les patients ont une mutation faux-sens qui change un acide aminé par un autre, ce qui est le cas pour environ 57% des patients atteints de la maladie de Fabry (Fan & Ishii, 2007). Ce changement affecte la conformation tridimensionnelle et ainsi la plupart de ces enzymes sont alors dégradées avant de pouvoir se rendre à l'appareil de Golgi (Fan, 2003). La thérapie par chaperons consiste à favoriser le bon repliement de l'enzyme par des petites molécules prises oralement afin de stabiliser l'enzyme dysfonctionnelle. Seulement les patients avec certaines mutations propices à la thérapie par chaperons pourront recevoir ce traitement (Benjamin et al., 2016; GalafoldTM, Migalastat, 2017).

Une thérapie de réduction de substrat a également été proposée pour traiter les patients atteints de la maladie de Fabry. Le principe serait d'inhiber en partie la production de glycosphingolipides pour éviter que ceux-ci ne s'accumulent dans l'organisme (Platt & Butters, 2004).

1.4 Les biomarqueurs

1.4.1 Définition d'un biomarqueur

Un biomarqueur est une molécule qui indique un changement dans des processus biologiques chez un individu. Ce changement doit être directement relié à des manifestations cliniques d'une pathologie. En clinique, ces biomarqueurs permettent de dépister et de diagnostiquer des patients atteints de différentes maladies, comme c'est le cas pour le dépistage des nouveau-nés où des maladies rares sont détectées, un traitement et une prise en charge sont apportés rapidement pour éviter le décès ou un retard intellectuel chez les bébés (Auray-Blais et al., 2007). Les biomarqueurs de ces maladies rares permettent donc de sauver des vies avant l'apparition de manifestations cliniques sérieuses chez l'enfant. Une fois diagnostiquée, il est possible de suivre l'évolution de la maladie en vérifiant le niveau de biomarqueurs chez le patient, ce qui permet une prise en charge adéquate (Cox, 2005).

1.4.2 Caractéristiques d'un biomarqueur idéal

Un biomarqueur idéal serait une molécule facilement quantifiable dans les liquides biologiques. L'idéal est que le liquide biologique soit facilement accessible d'une manière peu ou non invasive. Par exemple, un biomarqueur dans l'urine ou le sang serait plus facile d'accès pour le prélèvement comparé à des biomarqueurs retrouvés dans des biopsies ou dans le liquide céphalorachidien. De fait, ces derniers sont moins accessibles considérant les risques de complications lors du prélèvement, de même que la limite de la quantité d'échantillon pouvant être prélevée. La molécule doit aussi avoir une bonne stabilité pendant quelques heures dans sa matrice pour éviter une dégradation qui pourrait mener à des conclusions erronées lors de l'analyse. Aussi, la concentration du biomarqueur devrait être faible dans la population normale, mais devrait augmenter significativement en présence d'une pathologie spécifique. Le niveau de biomarqueur retrouvé devrait donc refléter la gravité de la pathologie; ainsi, une personne sévèrement atteinte devrait avoir une

concentration plus élevée du biomarqueur ciblé comparée à une personne légèrement affectée par la maladie. Le niveau de biomarqueur devrait diminuer rapidement lorsque le patient est pris en charge avec un traitement adéquat. Finalement, l'analyse de cette molécule devrait être rapide, fiable et peu coûteuse. Lorsqu'un biomarqueur présente quelques-unes de ces caractéristiques, il peut être envisagé de l'utiliser dans le domaine clinique (Cox, 2005).

1.4.3 Biomarqueurs de la maladie de Fabry

C'est en 1898 que la maladie de Fabry a été découverte simultanément, mais indépendamment par deux médecins, soit Johannes Fabry en Allemagne et William Anderson en Angleterre (Mehta et al., 2006). En 1963, les premiers biomarqueurs de la maladie de Fabry soit le globotriaosylcéramide (Gb₃) et le galabiosylcéramide (Ga₂) ont été découverts dans le rein d'un homme atteint et décédé due à une insuffisance rénale (Sweeley & Klionsky, 1963). Le globotriaosylcéramide ayant été trouvé en plus grande abondance à l'époque a fait en sorte que le galabiosylcéramide a été un peu délaissé dans les études suivantes. La structure du Gb₃ et de ses différents groupes d'isoformes et analogues est présentée à la Figure 6 et la structure du Ga₂ à la Figure 7.

Globotriaosylcéramide (Gb₃)

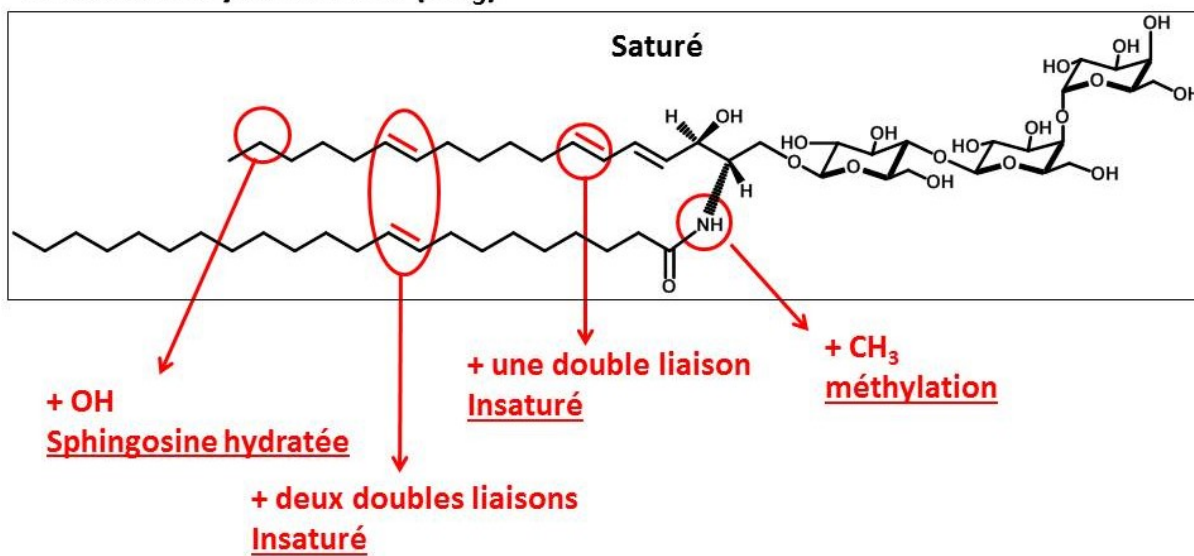


Figure 6. Structure de la molécule de globotriaosylcéramide Gb₃[(d18:1)(C22:0)], soit une molécule appartenant au groupe des isoformes et analogues saturés du Gb₃. Présentation des 5 groupes du Gb₃ avec les différentes modifications possibles menant aux groupes de Gb₃ méthylés, insaturés avec une double liaison au niveau de l'acide gras ou de la sphingosine, insaturé avec deux doubles liaisons, sur l'acide gras et la sphingosine, ou les deux doubles liaisons sur l'acide gras et du groupe avec une sphingosine hydratée.

Galabiosylcéramide (Ga₂)

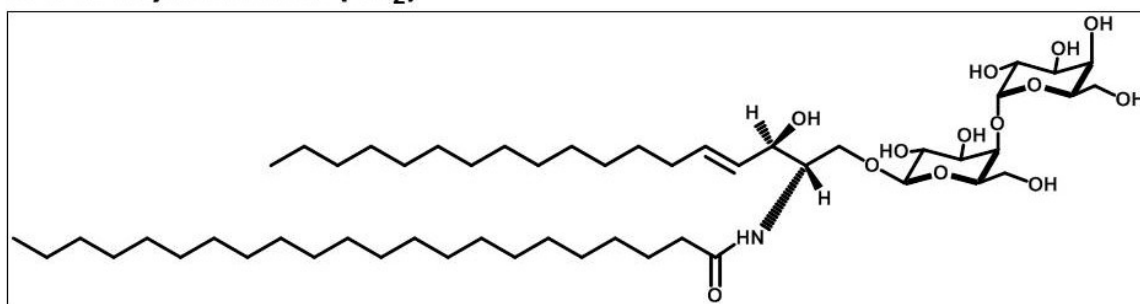


Figure 7. Structure de la molécule de galabiosylcéramide (Ga₂).

Le Gb₃ s'est avéré être un biomarqueur intéressant au niveau des liquides biologiques tels que l'urine et le plasma, ce qui a permis de mettre au point une méthode pour la détection de patients Fabry et monitorer et suivre à long terme ces derniers (Bowen et al., 2005; Fauler et al., 2005; Kitagawa et al., 2005; Mills et al., 2005; Roddy et al., 2005; Auray-Blais et al., 2007; Mehta et al. 2006; Barr et al., 2009; Ferreira et al. 2015). En 2005, une étude réalisée par Young et al. a été menée pour vérifier l'intérêt d'utiliser le Gb₃ comme

biomarqueur pour la maladie de Fabry dans l'urine et dans le plasma. Il a été démontré que le Gb₃ était augmenté dans l'urine et dans le plasma chez les hommes ainsi que chez certaines femmes avec la forme classique de la maladie. Pour ce qui est de la variante cardiaque de la maladie, le Gb₃ plasmatique n'était pas augmenté et l'urine pouvait présenter une augmentation de Gb₃, mais à un niveau moindre que chez les patients classiques. Il a aussi été également démontré que la thérapie d'enzyme de remplacement diminuait grandement le niveau de biomarqueurs. Ainsi, pour la forme classique de la maladie, le Gb₃ représente un bon biomarqueur, mais l'est moins dans le cadre de la variante cardiaque ou pour certaines femmes (Young et al., 2005).

En 2012, une étude métabolomique sur le globotriaosylcéramide a été réalisée dans l'urine de patients Fabry pour découvrir de nouveaux biomarqueurs pour ladite maladie. Cette étude a permis d'identifier 15 nouveaux isoformes et analogues du Gb₃ qui ont été répartis en 5 groupes : 1) les isoformes du Gb₃ avec des acides gras saturés; 2) les isoformes/analogues du Gb₃ avec une double liaison sur l'acide gras ou la sphingosine; 3) les isoformes/analogues du Gb₃ avec deux doubles liaisons sur l'acide gras et la sphingosine; 4) les analogues du Gb₃ avec une sphingosine hydratée; et 5) les isoformes méthylés du Gb₃ (Auray-Blais & Boutin, 2012, Provençal et al, 2016). Il est à noter que selon la nomenclature, les isoformes du Gb₃ se caractérisent par une modification au niveau de la chaîne d'acide gras, tandis que les analogues du Gb₃ représentent une modification au niveau de la sphingosine (Auray-Blais & Boutin, 2012). En 2013, une autre étude métabolomique sur le globotriaosylcéramide a été réalisée, mais cette fois au niveau du plasma de patients Fabry afin de découvrir davantage de biomarqueurs. Cette étude a mené à la découverte de 5 nouveaux biomarqueurs soit des Gb₃ avec une double liaison au niveau de la sphingosine, le Gb₃(d16:1)(C16:0), le Gb₃(d16:1)(C18:0), le Gb₃(d16:1)(C22:1), le Gb₃(d16:1)(C16:0) et le Gb₃(d18:1)(C14:0) (Manwaring et al., 2013). Puis en 2016, les isoformes et les analogues du Gb₃ ont également été analysés dans différents organes de souris Fabry afin de mieux comprendre les mécanismes par lesquels ils s'accumulent (Provençal et al., 2016). Cette étude a permis d'établir la distribution des isoformes et des analogues du Gb₃ dans différents organes tels le cerveau, le cœur, les reins, le petit intestin, le foie, les poumons, la rate, de même que le plasma de souris Fabry traitées et non traitées. Les résultats ont démontré que

les organes les plus atteints par l'accumulation de Gb₃ sont respectivement la rate, le petit intestin, les reins, les poumons, le cœur, le foie ainsi que le cerveau. Cette étude a donc mis en évidence d'autres organes, non présumés être atteints étant donné que les souris ne présentaient pas de symptômes touchant spécifiquement ces organes (Provençal et al., 2016).

C'est en 2008 que le globotriaosylsphingosine soit le lyso-Gb₃ a été découvert dans le plasma et qu'il a été proposé comme biomarqueurs pour la maladie de Fabry (Aerts et al., 2008). La structure de la molécule du lyso-Gb₃ est présentée à la Figure 8.

Globotriaosylsphingosine (Lyso-Gb₃)

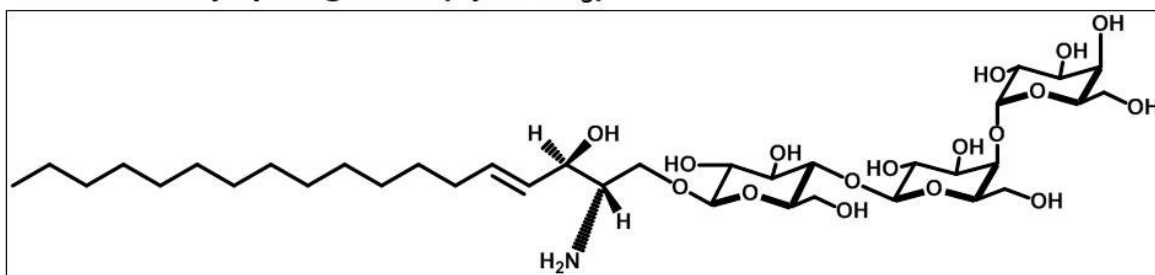


Figure 8. Structure de la molécule du globotriaosylsphingosine (lyso-Gb₃).

Cette molécule est similaire au Gb₃, mais celle-ci ne possède pas de chaîne d'acide gras, elle a donc subi une déacylation. L'article démontre une corrélation entre le traitement par TER et la diminution du lyso-Gb₃. Puis en 2010, la présence de lyso-Gb₃ dans l'urine a également été prouvée (Auray-Blais et al., 2010). Cette étude a permis de prouver que le lyso-Gb₃ était 1 000 fois moins abondant que le Gb₃ pour les femmes Fabry non traitées et 6 000 fois moins abondant pour les hommes Fabry non traités. Il a été démontré que le lyso-Gb₃ dans l'urine est un bon biomarqueur étant donné qu'il est présent en quantité considérable chez les patients Fabry et en très faible quantité chez les contrôles sains.

Par la suite, afin de découvrir des biomarqueurs qui pourraient prédire la sévérité et la progression de la maladie, des études métabolomiques ont permis de découvrir 7 analogues du lyso-Gb₃ dans l'urine et 6 analogues du lyso-Gb₃ dans le plasma (Auray-Blais et al., 2012; Boutin & Auray-Blais, 2014; Lavoie et al., 2013). Une découverte particulièrement intéressante pour le lyso-Gb₃ concerne la variante cardiaque de la maladie

de Fabry pour les patients avec la mutation p.N215S. Le Gb₃ des patients avec ladite mutation est souvent retrouvé en quantité normale dans l'urine, mais les analogues du lyso-Gb₃ sont augmentés (Auray-Blais et al., 2015; Auray-Blais et al., 2017). De même, chez les enfants Fabry avec la mutation p.N215S, le Gb₃ et le lyso-Gb₃ dans l'urine ont été trouvés en quantité normale tandis que les analogues du lyso-Gb₃ sont fortement augmentés comparés aux contrôles (Auray-Blais et al., 2015). Il est donc primordial d'évaluer un profil de biomarqueurs pour détecter efficacement les patients Fabry.

En ce qui concerne la seconde molécule découverte en 1963, soit le Ga₂ (voir la Figure 7), une étude réalisée en 2005 a démontré, en utilisant la spectrométrie de masse en tandem, que la concentration urinaire était plus élevée au niveau du Gb₃ que du Ga₂ comme il avait été affirmé en 1963. Par ailleurs, cette étude a également permis d'établir une corrélation entre le Gb₃ et le Ga₂ (Mills et al., 2005). Puis, une étude métabolomique de 2015 (Boutin & Auray-Blais, 2015) a permis de découvrir 22 nouveaux isoformes et analogues du Ga₂ dans l'urine de patients Fabry. Ces biomarqueurs étaient tous significativement plus abondants chez les hommes Fabry non traités que chez les hommes sains.

1.5 Principes de la spectrométrie de masse en tandem

1.5.1 Principes généraux

La spectrométrie de masse est une méthode d'analyse à la fine pointe de la technologie qui permet de détecter, de quantifier et de caractériser des structures chimiques. Les avantages de cette technique sont principalement sa grande sensibilité, sa spécificité et sa capacité à réaliser des analyses simultanées. Le processus d'analyse par spectrométrie de masse commence d'abord par l'entrée de l'échantillon dans l'appareil qui se fait couramment par chromatographie. Celle-ci peut s'effectuer par chromatographie liquide ultra performance (UPLC), par chromatographie liquide haute performance (HPLC) ou bien par chromatographie en phase gazeuse (GC). Dans tous les cas, elle permet de purifier l'échantillon en le séparant des molécules non désirées avant l'analyse au spectromètre de masse (Watson & Sparkman, 2008). Puis, afin d'analyser les molécules, celles-ci doivent être sous phase gazeuse et doivent être chargées selon un processus qui se produit au niveau de la source d'ions (Hoffmann & Stroobant, 2007). Il existe plusieurs types de sources

d'ionisation, les plus courantes sont l'ionisation électronique (IE), l'ionisation chimique (IC), l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI), l'ionisation par bombardement d'atomes rapides (FAB), la désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) et finalement celle utilisée dans cette étude, l'ionisation par électronébulisation (ESI). Dans le cadre de cette étude de maîtrise, la charge est donnée aux molécules par protonation, mais il existe plusieurs autres techniques pour ioniser des molécules soit la cationisation, la déprotonation, l'éjection d'électrons, la captation d'électrons ou bien le transfert d'ions. La séparation des ions est faite selon le rapport de la masse (m) divisée par la charge (z) soit m/z et cette étape est réalisée dans l'analyseur de masse. Il y a divers types d'analyseurs de masse, soit les analyseurs quadripolaires qui sont utilisés dans ce projet, la trappe ionique, le secteur magnétique, l'orbitrap, le temps de vol, etc. (Watson & Sparkman, 2008; Gross, 2010). Il est également possible de coupler des analyseurs de masse afin d'augmenter la versatilité des appareils. Les caractéristiques qui distinguent le plus un analyseur de masse d'un autre sont l'étendue de masse à atteindre, la vitesse d'analyse, la transmission soit le nombre d'ions qui se rendent au détecteur, la précision de la masse et la résolution, soit la capacité de distinction entre deux ions avec une petite différence au niveau du rapport m/z (Hoffmann & Stroobant, 2007). Finalement, les ions se rendent au détecteur qui transforme les ions incidents en courant électrique qui est proportionnel à leur abondance. Par la suite, les données peuvent être interprétées par des logiciels informatiques. Il est possible de séparer les détecteurs d'ions en deux classes soit les détecteurs qui permettent de compter les ions à une seule masse précise ou bien les détecteurs qui peuvent compter simultanément les ions selon plusieurs masses (Hoffmann & Stroobant, 2007). L'analyseur de masse ainsi que le détecteur sont tous deux maintenus sous vide par des pompes turbomoléculaires pour éviter des perturbations au niveau des champs magnétiques ou des forces électriques qui affecteraient le parcours ou la vitesse des ions avant qu'ils se rendent au détecteur (Watson & Sparkman, 2008; Gross, 2010). Les composantes d'un spectromètre de masse sont présentées à la Figure 9.

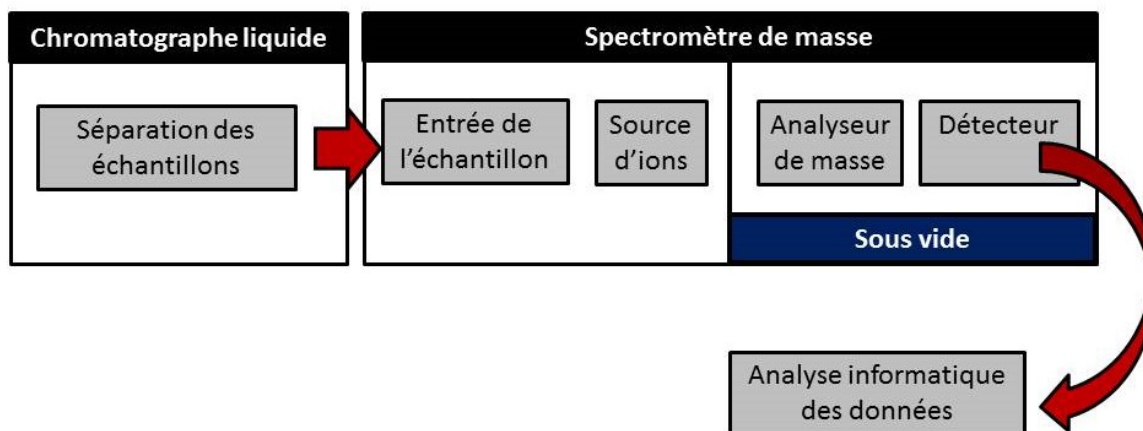


Figure 9. Composantes d'un spectromètre de masse.

1.5.2 Principe de la chromatographie liquide ultra performance (UPLC)

La chromatographie liquide est une méthode qui permet de séparer les molécules d'intérêt de la majorité des interférents provenant de l'échantillon. Cette technique est souvent utilisée avant l'analyse au spectromètre de masse afin d'obtenir l'échantillon le plus purifié possible. En comparaison avec la chromatographie liquide haute performance (HPLC), la chromatographie liquide ultra performance (UPLC) est une approche récente permettant des améliorations au niveau de la vitesse, de la sensibilité et de la résolution des analyses. La différence repose principalement sur la petite taille des particules présentes dans la phase stationnaire des colonnes UPLC qui sont moins de 2 μm comparativement à 3-5 μm en HPLC. Cela permet d'augmenter le débit des phases mobiles, ainsi que la pression dans la colonne, ce qui mène à l'amélioration de la séparation des molécules (Sridhar et al., 2013). Les molécules présentes dans la phase stationnaire doivent à la fois permettre de créer une rétention et une sélectivité des molécules à analyser. Les analytes seront emportés par les phases mobiles, mais seront retardés par leurs interactions avec la phase stationnaire. Le temps de rétention des analytes est défini comme le temps écoulé entre l'injection de l'échantillon et l'élution des molécules. Celui-ci sera affecté par la nature des analytes, par la phase stationnaire et par les phases mobiles. Une phase stationnaire d'une colonne BEH C8 (Waters Corp.) qui contient une chaîne alkyle de huit atomes de carbones (tel qu'utilisée pour ce projet), retiendra davantage les molécules non polaires, tandis que les molécules plus polaires seront plus facilement expulsées avec les phases mobiles étant elles-mêmes polaires.

En comparaison, une colonne BEH C18 constituée de 18 atomes de carbones retiendra encore plus les molécules non-polaires que la colonne BEH C8 (Shrader, 2014).

1.5.3 Principe de l'électronébulisation

L'électronébulisation se produit au niveau de la source de l'appareil et débute par le passage de la solution dans un capillaire sur lequel une forte différence de potentiel est appliquée. Le liquide sera vaporisé dans le champ électrique en fines gouttelettes qui se dirigeront vers le spectromètre de masse, formant le cône de Taylor à l'extrémité du capillaire. Ces gouttelettes posséderont un excès de charges positives ou négatives dépendamment de la polarité du capillaire. Pour cette étude, l'électronébulisation est en mode positif, donc les ions auront une charge positive. Les gouttelettes diminueront de diamètre à cause de l'évaporation du solvant par le gaz nébulisant avec une haute température dans la chambre d'évaporation, ce qui provoquera une répulsion coulombienne de plus en plus forte, engendrant une nébulisation de gouttelettes plus petites. À la fin de ce processus, il y aura une production d'ions où le solvant sera totalement évaporé. Ces ions pourront par la suite entrer dans le spectromètre de masse (Watson & Sparkman, 2008; Hoffmann & Stroobant, 2007). Une schématisation du principe de l'ESI est présentée à la Figure 10.

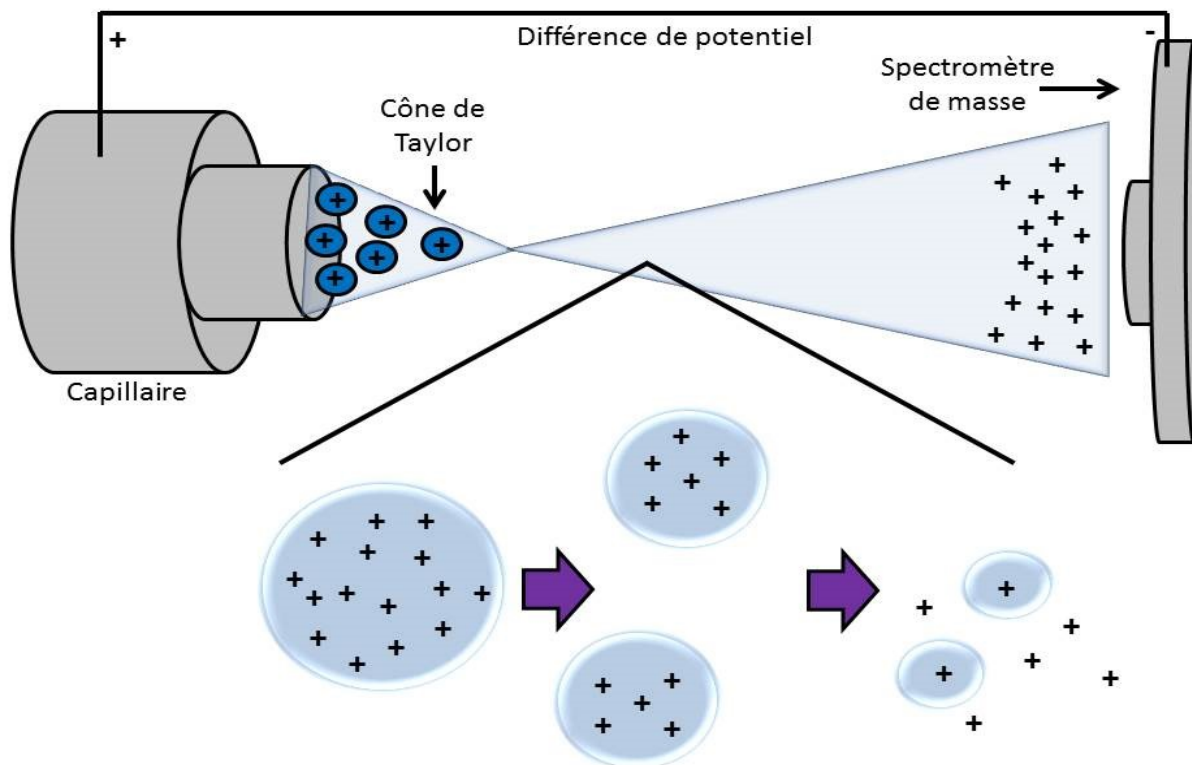


Figure 10. Principes de l'électronébulisation en mode positif en spectrométrie de masse.

1.5.4 Différents modes d'acquisition de l'analyseur

L'analyseur en temps de vol (TOF) permet de mesurer le temps que prennent les ions à parcourir la distance entre la source d'ions et le détecteur. Au départ, les ions reçoivent tous la même énergie cinétique, mais comme ces ions ont des rapports m/z différents, ils ont donc une différente vitesse. Les ions avec les rapports m/z plus élevés seront plus lents dans le trajet à parcourir tandis que les rapports m/z plus faibles seront plus rapides (Hoffmann & Stroobant, 2007). Les analyseurs en temps de vol sont surtout utilisés dans le but d'identifier des structures chimiques de molécules et d'établir des masses exactes pour certaines molécules.

Le quadripôle est un autre des types d'analyseur de masse disponible et est principalement utilisé pour quantifier des molécules spécifiques. Il est composé de quatre tiges métalliques en paires et opposées sur lesquelles un courant direct ainsi qu'une radio-fréquence sont appliqués (présenté à la Figure 11). Le potentiel est opposé sur les paires de tiges. En

appliquant un courant direct et une radio-fréquence spécifiques, il est possible de stabiliser la trajectoire des ions avec un rapport m/z spécifique, afin qu'ils se rendent au détecteur, tandis que les autres ions seront déviés de leur trajectoire et ne se rendront jamais au détecteur (Watson & Sparkman, 2008).

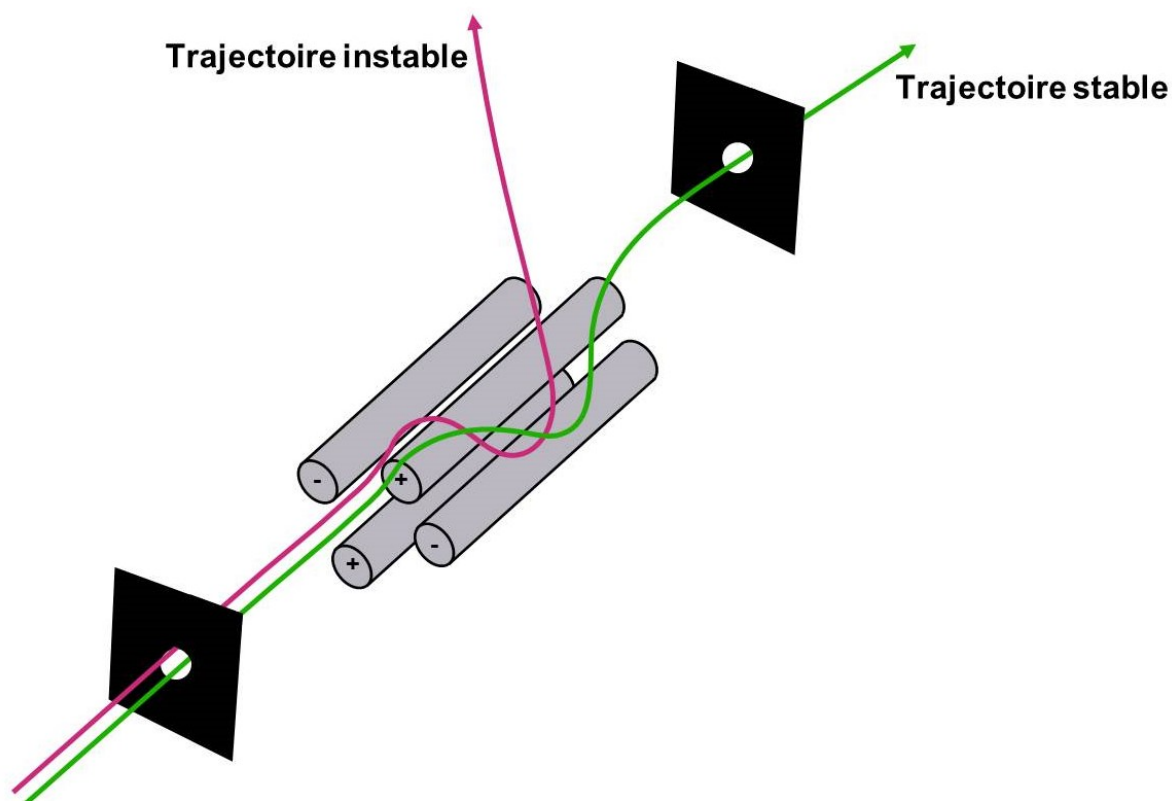


Figure 11. Quadripôle et ses 4 tiges métalliques pairées.

Il est également possible d'utiliser deux quadripôles séparés par une chambre à collisions soit un hexapôle rempli d'un gaz inerte, dans notre cas l'argon. Ce principe est appelé la spectrométrie de masse en tandem. Ainsi, le premier quadripôle permet de sélectionner des ions avec un rapport m/z spécifique. Ensuite, ces ions appelés ions précurseurs se rendront à la chambre à collision (hexapôle), puis entreront en collision avec le gaz inerte, ce qui fragmentera l'ion précurseur en plusieurs ions produits. Finalement, le troisième quadripôle permettra de sélectionner des ions avec un autre rapport m/z spécifique et ces derniers atteindront finalement le détecteur.

La spectrométrie de masse en tandem permet de travailler avec différents modes d'acquisition. D'abord, il est possible d'utiliser le mode de balayage d'ions produits « Product ion scan ». Ce mode consiste à sélectionner un rapport m/z spécifique au premier quadripôle soit les ions précurseurs et ceux-ci se fragmenteront dans la chambre à collisions pour former des ions produits qui seront tous détectés par l'appareil. Ensuite, il est possible d'utiliser le mode de balayage d'ions précurseurs « Precursor ion scan ». Le spectromètre de masse est alors réglé pour laisser passer de multiples ions à fragmenter dans la chambre à collisions selon une étendue de masse sélectionnée et le deuxième quadripôle est fixé pour un m/z spécifique pour les ions produits. Il est aussi possible d'utiliser le mode de monitoring de réactions multiples « Multiple Reaction Monitoring », soit le mode MRM. Celui-ci permet de sélectionner des rapports m/z spécifiques aux premier et deuxième quadripôles, avec fragmentation dans la chambre à collisions, ce qui permet une plus grande spécificité dans l'analyse de molécules en particulier. Une coupe transversale schématique de l'acquisition en mode MRM qui a été utilisée dans ce projet est présentée à la Figure 12.

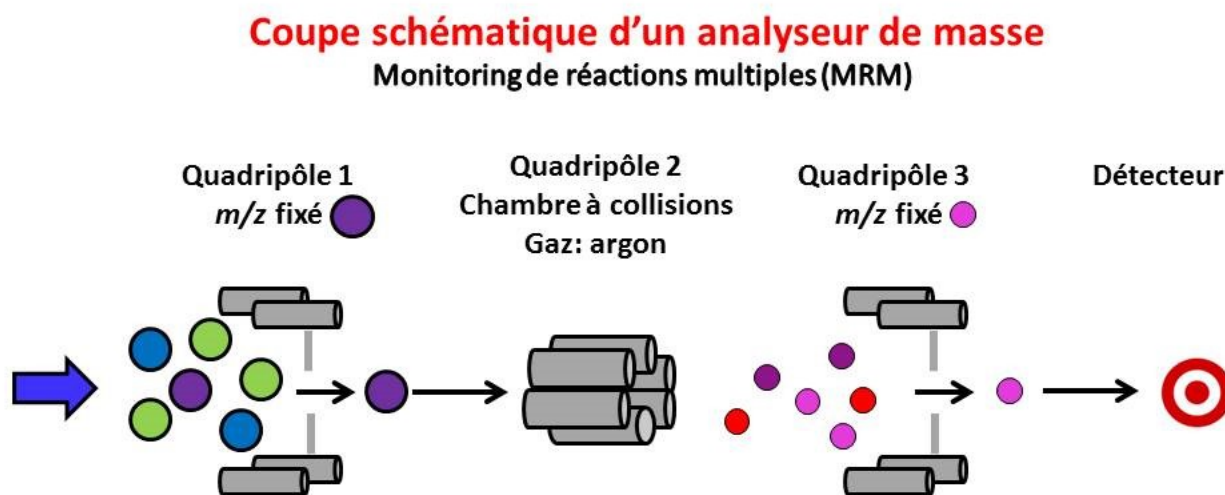


Figure 12. Principe d'un spectromètre de masse en tandem en mode d'acquisition de Monitoring de Réactions Multiples (MRM).

Finalement, il est aussi possible de travailler en mode de perte constante de neutre « Constant neutral loss ». Ce mode permet de rechercher les ions précurseurs qui se fragmentent en perdant un fragment neutre en particulier.

1.5.5 Standard interne

Lorsque des molécules doivent être quantifiées par spectrométrie de masse, certaines variations provenant des étapes de préparation et de l'analyse des échantillons peuvent influencer le résultat. Ces variations peuvent être causées par la préparation elle-même de l'échantillon, par l'injection de l'échantillon par chromatographie liquide ou par l'ionisation des molécules dans le spectromètre de masse. Afin d'éliminer ou de diminuer de nombreuses sources d'erreurs de manipulation ainsi que les variations causées par la méthode ou l'appareil utilisé, il est préférable d'ajouter un standard interne.

Un standard interne est une molécule similaire à celle qui doit être quantifiée. Le standard interne choisi doit avoir des propriétés chimiques et physiques semblables à la molécule d'intérêt. La méthode reliée à l'ajout d'un standard interne consiste d'abord à établir une courbe de calibration en ajoutant la molécule de référence à chaque échantillon et à augmenter de manière croissante la quantité du composé à analyser. Ainsi, il y a une corrélation entre l'intensité du signal obtenu et la quantité de composés à analyser. En se rapportant à cette courbe de calibration, la quantification d'un échantillon inconnu possédant une quantité de standard interne connue est possible. Il est important d'ajouter le standard interne aux échantillons le plus tôt possible lors des manipulations afin d'obtenir le plus de précision possible. Puisque les composés sont similaires et qu'ils subissent les mêmes traitements, leurs pertes et les erreurs seront similaires alors le rapport entre les deux molécules restera inchangé durant la procédure. Comme la quantité du standard interne dans les échantillons est connue, tout comme le rapport entre les deux molécules, il est possible de corriger les erreurs reliées aux manipulations, les pertes au cours de l'extraction de l'échantillon, de l'injection par la chromatographie liquide dans le spectromètre de masse, ainsi que dans l'analyse au spectromètre de masse causée par la suppression ionique (effet de matrice) au niveau des échantillons. Lors de la chromatographie, le standard interne se comporte de manière similaire au produit analysé de sorte qu'il devient possible d'utiliser le temps de rétention de la molécule d'intérêt en fonction de celui obtenu pour la molécule de référence.

Le choix d'un standard interne est fait selon plusieurs considérations. Celui-ci doit être le plus similaire possible à la molécule à quantifier au point de vue chimique et physique, il ne doit pas réagir avec les composés de l'échantillon et il doit être absent de l'échantillon à analyser. Il peut être synthétisé et parfois même absent dans la nature.

Il existe plusieurs types de standards internes, les analogues de structure en sont un exemple et sont utilisés dans le cadre de ce projet. Ces molécules sont identiques à celles devant être quantifiées sauf que celles-ci sont étiquetées avec des isotopes stables comme ^2H , ^{13}C et ^{18}O et permettent d'avoir des masses différentes entre les deux molécules et par conséquent être détectées avec un m/z différent lors de l'analyse au spectromètre de masse. Le standard interne utilisé pour ce projet était le Gb₃ avec une chaîne d'acide gras de 18 carbones ayant trois hydrogènes deutérés. L'utilisation de telles molécules a l'avantage d'obtenir des résultats très similaires à ceux de la molécule d'intérêt en ce qui concerne le recouvrement lors de l'extraction, ainsi que pour les temps de rétention durant la chromatographie liquide et pour l'ionisation lors de la spectrométrie de masse.

Sans l'utilisation d'un standard interne, le coefficient de variation peut être de plusieurs fois supérieur à celui obtenu lors de l'analyse avec un standard interne et l'exactitude des résultats sera alors fortement biaisée.

1.5.6 Effet de matrice

L'effet de matrice en spectrométrie de masse a d'abord été décrit en 1993 et peut être défini comme étant la différence entre la réponse d'un analyte dans une solution standard et la réponse de ce même analyte obtenue dans une matrice biologique (Kearle & Tang, 1993). Cette différence est due aux métabolites présents dans les matrices biologiques qui co-éluent avec les analytes d'intérêt, ce qui cause une interférence dans l'ionisation de l'analyte en question. Les interférences peuvent se présenter sous forme de suppression ionique ou dans certains cas par l'augmentation du signal des ions (Chambers et al., 2007). Il existe plusieurs méthodes pour préparer les échantillons avant l'analyse au spectromètre de masse, afin d'éliminer le maximum de métabolites interférents soit par précipitation de protéines, par une extraction liquide-liquide ou par une extraction en phase solide. La chromatographie liquide

permet également de réduire l'effet de matrice en utilisant des gradients de phases mobiles optimisés permettant de séparer l'élution des analytes d'intérêt de l'élution des métabolites interférents (Chambers et al., 2007). Il est également possible de réduire l'effet de matrice en injectant un moins grand volume d'échantillon ou bien en diluant les échantillons, ce qui permet de réduire la quantité de molécules interférentes. Les standards internes peuvent aussi servir à compenser les effets de matrice subis en réajustant la concentration des analytes selon la concentration du standard interne détectée en fonction de sa concentration connue au départ (Van Eeckhaut et al., 2009). Dans le cadre de ce projet, une extraction liquide-liquide a permis d'éliminer plusieurs métabolites interférents dans les échantillons. Aussi, la chromatographie liquide a été optimisée afin de minimiser le plus possible l'effet de matrice causé par les métabolites interférents non éliminés et l'ajout du standard interne dans les échantillons a permis de compenser l'effet de matrice résiduel.

1.6 Le sang périphérique

Dans le cadre de ce projet de recherche, les leucocytes, les lymphocytes B, les monocytes et le plasma sont les éléments du sang périphérique principalement étudiés. Néanmoins, afin de faciliter la compréhension de cette section du mémoire, nous avons préféré décrire les différentes composantes présentes dans le sang périphérique.

1.6.1 Les érythrocytes

Les globules rouges représentent 45% du sang total. Leur rôle est de transporter l'oxygène aux cellules du corps. Ces cellules ne possèdent pas de noyau. Les hémoglobines sont les protéines actives dans le transport des gaz et sont formées de quatre molécules d'hèmes possédant chacune un atome de fer ainsi que d'une protéine globulaire, la globine. La globine est formée de quatre chaînes polypeptidiques, soit deux chaînes alpha et deux chaînes bêta. L'atome de fer présent au cœur des molécules d'hèmes a la capacité de se lier de manière réversible avec une molécule d'oxygène, ce qui permet le transport de ce gaz. D'autres protéines sous forme fibreuse sont présentes dans les érythrocytes afin de préserver l'intégrité de leur membrane.

1.6.2 Le plasma

Le plasma représente environ 55% du sang total. Il est composé essentiellement d'eau, soit environ 90%. Il est également composé d'une centaine de différents solutés, tels des électrolytes comme le sodium, le potassium et le phosphate. Il y a aussi présence de protéines qui permettent de conserver une bonne pression osmotique avec les tissus, par exemple l'albumine qui représente 60% des protéines retrouvées dans le plasma. On retrouve des nutriments comme du glucose, des acides gras, du glycérol, des triglycérides, mais aussi des sous-produits du métabolisme cellulaire comme la créatinine ou bien des gaz provenant de la respiration et finalement on peut également retrouver des hormones (Marieb & Hoehn, 2013).

1.6.3 Les leucocytes

Dans le cadre du projet de recherche, le total des leucocytes ainsi les lymphocytes B et les monocytes ont été analysés chez des patients atteints de la maladie de Fabry et chez des contrôles sains. Ces cellules possédaient des intérêts particuliers dans le cadre de la maladie étudiée. Les leucocytes représentent l'ensemble des globules blancs présents dans le sang et proviennent tous de cellules souches hématopoïétiques, les hémocytoblastes qui possèdent tous un noyau contrairement aux globules rouges. Les leucocytes représentent moins de 1% du sang total. Ces cellules permettent la protection contre les bactéries, les virus, les parasites, les toxines et les cellules tumorales. Les globules blancs ont la capacité de s'échapper des vaisseaux sanguins par diapédèse afin d'exercer leurs fonctions, en réagissant aux substances chimiques libérées par les cellules endommagées ou par d'autres leucocytes. Les leucocytes peuvent être séparés en deux classes soit les granulocytes et les agranulocytes. Les granulocytes contiennent les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles et les agranulocytes comprennent les lymphocytes et des monocytes (Marieb & Hoehn, 2010). Une schématisation de la différenciation des cellules souches hémocytoblastes en différents types de leucocytes est présentée à la Figure 13.

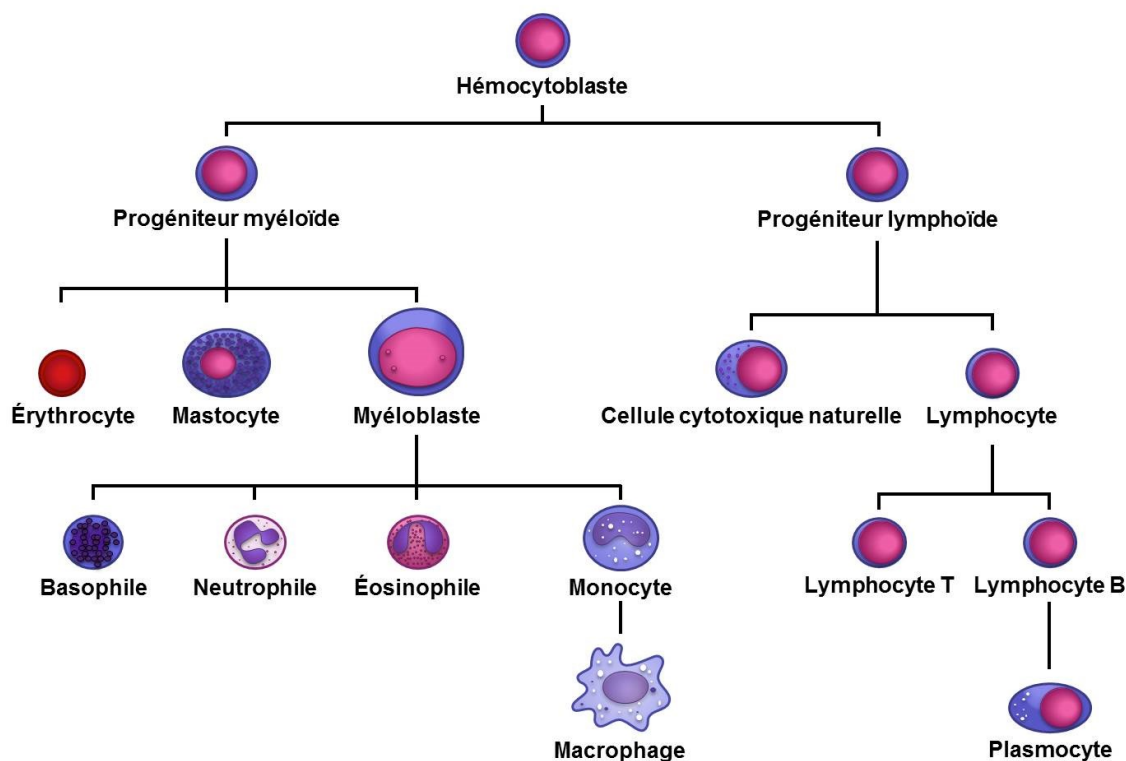


Figure 13. Différenciation des cellules souches hémocytoblastes en cellules plus spécialisées, notamment en leucocytes regroupant les lymphocytes T, les lymphocytes B, cellules cytotoxiques naturelles, les monocytes, les éosinophiles, les neutrophiles et les basophiles.

Les lymphocytes représentent plus de 25% des leucocytes. Il y a d'abord une classe de lymphocytes granulocytes, les cellules cytotoxiques naturelles soit les cellules NK qui font partie de la réponse innée du système immunitaire. Ces dernières ont la capacité de tuer les cellules tumorales et les cellules infectées avant même que le système immunitaire entre en action. Il y a également les lymphocytes agranulocytes que l'on peut séparer en deux groupes soit les lymphocytes B et les lymphocytes T qui forment la réponse immunitaire adaptative. Cette réponse met plus de temps avant d'intervenir, mais permet de fournir une réponse immunitaire plus puissante contre l'envahisseur. Ces cellules sont présentes sous forme immature et inactive, mais à la rencontre d'un antigène soit une molécule spécifique présente à la surface d'un envahisseur, il y a un processus de sélection, de maturation et de différenciation de ces lymphocytes. Les lymphocytes B engendrent des plasmocytes qui produisent des anticorps soit des immunoglobulines. Ces anticorps se lieront aux antigènes

des envahisseurs afin de les inactiver et par la suite ces envahisseurs seront phagocytés et dégradés par les macrophages. Les lymphocytes T ont plusieurs fonctions comme combattent les cellules infectées par un virus ou les cellules tumorales grâce à leur fonction cytotoxique ou bien venir en aide aux macrophages et aux lymphocytes B (Parham, 2009).

Les monocytes représentent entre 3 et 8% des cellules blanches. Les monocytes peuvent quitter la circulation sanguine par diapédèse et une fois rendus aux tissus, ils se différencient en macrophages qui ont une grande capacité de phagocytose. Dans le cas d'infections prolongées, ce sont ces cellules qui prendront la relève suite au passage des neutrophiles afin d'éliminer les débris ou les pathogènes (Marieb & Hoehn, 2013).

Les neutrophiles sont les cellules blanches les plus abondantes, elles représentent entre 50 à 70% des leucocytes. Ce sont des cellules granulocytes qui possèdent des peroxydases et des enzymes hydrolytiques qui permettent de lyser la membrane plasmique des cellules visées afin de les éliminer. Les neutrophiles sont chimiquement attirés aux sites d'inflammation et s'y accumulent rapidement afin de combattre les bactéries. Leur fonction de phagocytose leur permet d'éliminer les bactéries, les toxines et les cellules mortes. (Marieb & Hoehn, 2013; Parham, 2003).

Les éosinophiles composent entre 2 à 4% des leucocytes. Ce sont des cellules granulocytes qui possèdent des enzymes très spécifiques. Ils n'ont pas la capacité d'éliminer les bactéries, mais peuvent détruire les parasites trop gros pour être phagocytés. Ils sont responsables des troubles comme l'asthme ou les allergies (Marieb & Hoehn, 2013).

Les basophiles sont les leucocytes les moins abondants dans le sang soit entre 0,5 à 1%. Ce sont des cellules granulocytes qui contiennent de l'histamine. L'histamine possède des fonctions de vasodilatation, d'augmentation de la perméabilité des capillaires sanguins et permet d'attirer d'autres leucocytes aux sites d'inflammation (Marieb & Hoehn, 2013).

Dans ce projet, nous ciblerons les isoformes et analogues du Gb₃ qui se trouvent dans les leucocytes totaux, les lymphocytes B et les monocytes, de même que le plasma et l'urine.

1.7 Les caractéristiques des cellules de patients Fabry

1.7.1 Perturbation des leucocytes associés à la maladie de Fabry

Une étude au niveau des cellules blanches a démontré la perturbation dans la distribution des sous-groupes de leucocytes chez les patients Fabry (Rozenfeld et al., 2009). L'étude a été réalisée chez 11 hommes Fabry sans aucun traitement et chez 11 hommes Fabry traités par TER, ainsi que chez des contrôles sains. La cytométrie de flux a permis de compter les populations de sous-groupes de leucocytes. Afin de déterminer la concentration du Gb₃ intracellulaire, des anticorps monoclonaux spécifiques au Gb₃ ont été utilisés, car ils émettent de la fluorescence dont l'intensité est quantifiable. Cette étude a permis de constater que les patients Fabry traités ou non traités ont une tendance à avoir une augmentation du nombre de lymphocytes B et une diminution des monocytes. Les lymphocytes B des patients Fabry présentaient une augmentation significative du Gb₃ intracellulaire comparativement aux contrôles sains. Cette étude a également permis d'observer que le Gb₃ intracellulaire pourrait mener vers un meilleur suivi des patients Fabry.

1.7.2 Apoptose des cellules de patients Fabry

Étant donné la mise en évidence du débalancement des leucocytes (Rozenfeld et al., 2009), ainsi que les démonstrations d'état pro-inflammatoire dans l'endothélium et les leucocytes des patients Fabry (DeGraba et al., 2000), cette étude s'intéresse à l'apoptose des cellules qui pourraient jouer un rôle au niveau des processus physiopathologiques de la maladie de Fabry (De Francesco et al., 2011). Les échantillons de cellules mononucléées du sang périphérique de 16 hommes et 16 femmes atteints de la maladie de Fabry, dont 17 traités par TER, ainsi que 30 échantillons de contrôles sains ont été analysés pour vérifier les niveaux d'apoptose. Ainsi, il a été prouvé que les niveaux d'apoptose chez les patients Fabry non traités étaient significativement plus élevés que les contrôles sains. Pour ce qui est des patients Fabry traités, ceux-ci présentaient des niveaux d'apoptose moins élevés que chez les patients non traités, mais toujours significativement différents des contrôles sains. Il a également été possible de confirmer que l'activation des caspases a joué un rôle dans l'induction de l'apoptose des cellules puisqu'il y avait un niveau augmenté des caspases 3, soit des marqueurs de l'apoptose.

Afin de vérifier si le Gb₃ induit d'une certaine manière l'apoptose, des cellules mononucléées du sang périphérique provenant de contrôles sains ont été traitées avec une quantité de Gb₃ similaire à celle retrouvée au niveau du plasma de patients atteints de la maladie de Fabry. Après 3 h d'incubation avec l'ajout de Gb₃, un maximum du taux d'apoptose ainsi qu'un nombre élevé de cellules mortes ont été détectés (De Francesco et al., 2011). Les conclusions de cette étude ont été que les cellules mononucléées du sang périphérique ont un taux plus élevé d'apoptose qu'il est possible d'attribuer à l'augmentation de Gb₃ dans les cellules.

1.7.3 Localisation du Gb₃ intracellulaire

Dans le but de localiser le Gb₃ dans différents tissus, une étude immunohistochimique a été réalisée dans des biopsies, des autopsies et des cultures cellulaires de patients atteints de la maladie de Fabry traités par TER depuis plusieurs années (Askari et al., 2007). Les résultats de l'analyse qualitative de la coloration du Gb₃ ont permis de démontrer une importante hétérogénéité dans la distribution du Gb₃ entre les organes, mais également une concentration significative de Gb₃ dans le cœur et dans les reins. L'immunohistochimie au niveau des compartiments cellulaires a révélé l'accumulation de Gb₃ dans les lysosomes, propres à la maladie de Fabry, telle que décrit dans la littérature. Cette étude a également démontré une accumulation du Gb₃ au niveau d'autres compartiments cellulaires comme pour le noyau, le réticulum endoplasmique et les membranes cellulaires. Finalement, cette étude a dévoilé que même après cinq années de TER, il y avait une quantité considérable de Gb₃ dans les cellules et les tissus qui n'était pas éliminée. Cette étude a mis en lumière le besoin d'investiguer l'accumulation et la distribution du Gb₃ dans les tissus, mais également dans les structures cellulaires (Askari et al., 2007).

1.8 Présentation du projet

1.8.1 Problématiques et hypothèse entourant la maladie de Fabry

À ce jour, il n'existe toujours pas de biomarqueur idéal permettant d'évaluer la sévérité et la progression de la maladie de Fabry chez les patients atteints. Bien que les études métabolomiques effectuées par notre équipe dans les années antérieures nous aient permis d'identifier de nouveaux glycosphingolipides impliqués dans la maladie, les connaissances au niveau de la distribution de ceux-ci au niveau cellulaire sont à l'heure actuelle, toujours

déficiences. Les mécanismes encore méconnus au niveau de la répartition de ces biomarqueurs au niveau des cellules sanguines pourraient permettre d'évaluer la sévérité et la progression de la maladie de Fabry chez les personnes atteintes. Il y a plusieurs variantes génétiques pour la maladie de Fabry et des connaissances plus approfondies au niveau cellulaire indiquant la sévérité de la présentation de la maladie pourraient être des éléments clés pour offrir des traitements optimaux pour chacun des patients en leur apportant une médecine personnalisée. Ces problématiques mettent en lumière de nouvelles questions face à la maladie de Fabry telles : quelle est la distribution des glycosphingolipides dans les différents types de cellules sanguines? Est-ce que la distribution de ces biomarqueurs varie en fonction du sexe ou de l'âge ou du génotype? Est-ce possible de prédire la sévérité et la progression de la maladie en fonction de cette distribution de biomarqueurs?

Notre hypothèse de recherche était que la quantité des isoformes et analogues du Gb₃ serait plus abondante dans le total des leucocytes que dans les lymphocytes B et les monocytes pris séparément et que la distribution des biomarqueurs serait différente dans ces types cellulaires.

1.8.2 Objectifs

L'objectif principal de ce projet de maîtrise était de comprendre les mécanismes biochimiques et la physiopathologie de la maladie de Fabry par l'analyse de biomarqueurs au niveau cellulaire de patients atteints de la maladie. Les objectifs secondaires étaient: 1) de développer et valider une méthode en spectrométrie de masse en tandem couplée à une chromatographie liquide ultra performance (UPLC-MS/MS) pour la quantification relative des isoformes/analogues du Gb₃; 2) d'évaluer ces biomarqueurs dans le total des leucocytes, les lymphocytes B, les monocytes, le plasma et l'urine des patients Fabry et des contrôles sains appariés avec le sexe et l'âge; et 3) d'établir des corrélations entre la quantité relative de ces biomarqueurs et le génotype des patients traités ou non.

1.8.3 Isolation et purification des différents types cellulaires

Afin d'isoler le total des leucocytes, une solution de dextran à 6% qui permet de créer un gradient de densité a été utilisée. Ainsi, suite à une incubation à 37°C pendant une heure, les globules rouges se retrouvent à l'interface inférieure, tandis que le plasma et les globules

blancs se retrouvent à la phase supérieure. Une photographie de cette séparation est présentée à la Figure 14. En récupérant et en centrifugeant la phase supérieure, il est possible d'éliminer le plasma qui se retrouve à la phase supérieure et ainsi conserver les globules blancs.

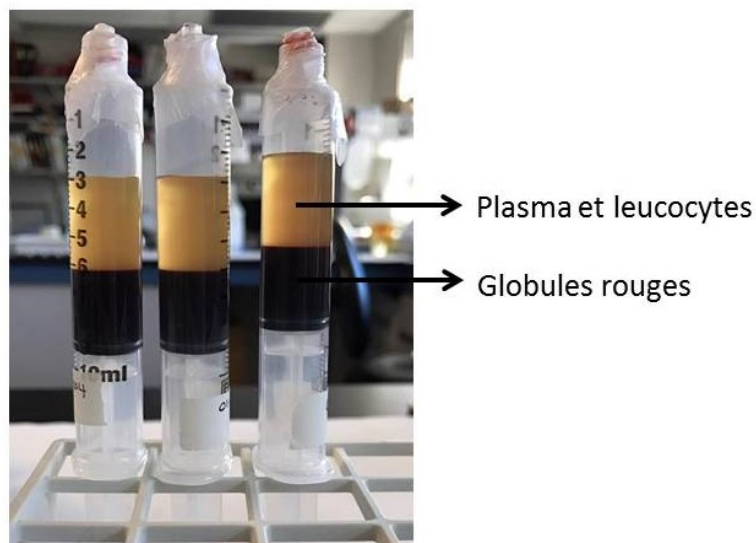


Figure 14. Résultat de l'isolation des leucocytes à partir d'une solution de dextran à 6%, suite à 1 h d'incubation à 37 °C.

Malheureusement, suite à ce protocole, des globules rouges résiduels sont demeurés présents dans le culot de leucocytes. Un protocole a donc dû être mis en place afin d'éliminer les globules rouges. Une photographie de ce culot de leucocytes est présentée à la Figure 15.



Figure 15. Résultat de la séparation du culot de leucocytes non purifié et contaminé par des globules rouges résiduels.

Plusieurs essais ont été faits pour réussir à éliminer les globules rouges de façon optimale. De fait, l'élimination des globules rouges a d'abord été testée avec des solutions de lavages hypertoniques soit une solution à 0,225% de NaCl et une solution à 1,575% de NaCl. Les solutions hypertoniques permettent de lyser les globules rouges et de libérer leur contenu

dans le surnageant tout en préservant les leucocytes. Le premier lavage était fait avec 4 mL de la solution à 0,225% de NaCl, laisser à température pièce pendant 5 minutes, puis centrifuger pour éliminer le surnageant. Les mêmes étapes ont été répétées pour le second lavage, mais avec la solution à 1,575% de NaCl. Cependant avec cette méthode, la purification n'était pas optimale et il restait encore quelques globules rouges visibles à l'œil dans l'échantillon. Il a donc fallu trouver une autre méthode de purification des leucocytes. Un autre test avec du chlorure d'ammonium à 0,8% ainsi qu'avec 0,1 mM d'EDTA a été réalisé afin d'éliminer les globules rouges. Le processus débutait par l'ajout d'un volume de chlorure d'ammonium à un rapport 9:1 avec l'échantillon de cellules. Puis, l'échantillon devait être bien mélangé par inversion et laisser reposer sur glace pendant 10 minutes. Finalement, l'échantillon devait être lavé deux fois avec une solution tampon. Même avec ce procédé, il y avait toujours présence de globules rouges résiduels.

Une méthode reposant sur l'utilisation d'anticorps spécifiques aux globules rouges a été testée et retenue pour l'étude. Ces anticorps sont spécifiques aux glycophorines A, des marqueurs spécifiques présents à la surface des globules rouges. En ajoutant des billes magnétiques conçues pour se lier spécifiquement aux anticorps préalablement ajoutés celles-ci sont en mesure de retenir les globules rouges lorsque l'échantillon est mis dans le support magnétique. Ainsi, l'échantillon élué correspond à la fraction des leucocytes purifiés sans qu'aucun globule rouge résiduel ne soit présent. Une photographie du support magnétique est présentée à la Figure 16 et une photographie de l'élimination des globules rouges est présentée à la Figure 17.



Figure 16. Support magnétique utilisé pour retenir les cellules liées aux anticorps et couplées aux billes magnétiques.



Figure 17. Globules rouges éliminés du culot de leucocytes suite à l'incubation sur le support magnétique de l'échantillon avec l'ajout des anticorps de glycophorines A et des billes magnétiques.

Un autre des problèmes rencontrés était la solution tampon suggérée par la compagnie ayant fourni les anticorps et les billes magnétiques. La solution tampon initiale était du « Phosphate Buffered Saline » soit du PBS qui comportait 2% de « Foetal Bovine Serum » soit du FBS ainsi que 1 mM d'EDTA. En fait, le FBS retrouvé dans cette solution comporte une certaine quantité de glycosphingolipides qui pouvait dès lors interférer avec nos résultats obtenus dans les cellules sanguines à l'étude. Pour éliminer les sources de contamination, une autre solution tampon a été utilisée. Cette dernière était constituée de PBS avec 0,5% de « Bovine Serum Albumin » soit de la BSA, ainsi que 1 mM d'EDTA. Les Figures 18 et 19 présentent respectivement les résultats obtenus pour la réponse (aire des biomarqueurs/aire du standard interne) en spectrométrie de masse en tandem de certains isoformes/analogues du Gb₃ dans des échantillons de lymphocytes B et de monocytes traités avec les différentes solutions tampons. Le standard interne utilisé était le Gb₃(d18:1)(C18:0)D3 étant donné que cette molécule est identique au Gb₃(d18:1)(C18:0) à l'exception de ses trois hydrogènes deutérés. Ainsi, cette molécule exogène se comporte exactement comme les molécules endogènes permettant d'obtenir le même temps de rétention lors de la chromatographie liquide et ainsi de corriger pour les effets de matrice dans les échantillons.

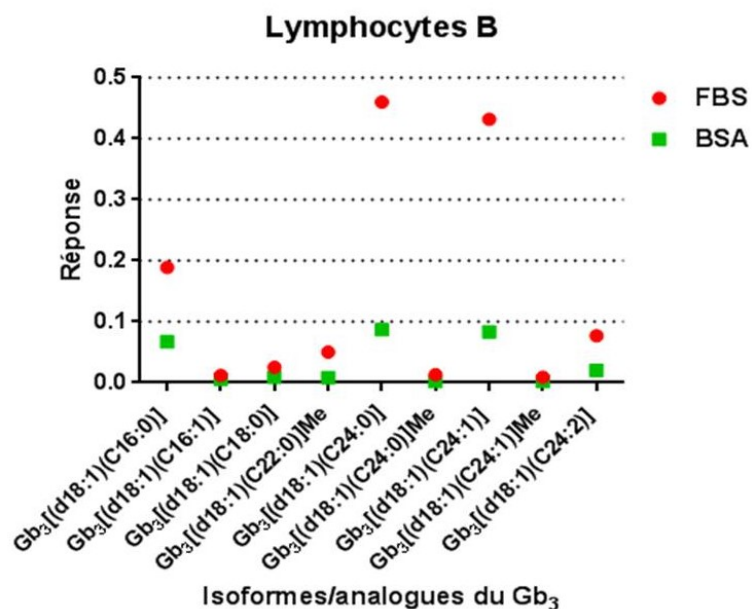


Figure 18. Comparaison de la réponse de certains isoformes et analogues du Gb₃, analysés en spectrométrie de masse en tandem à partir d'échantillons de lymphocytes B traités avec une solution tampon contenant 2.0% de FBS ou avec une solution tampon contenant 0.5% de BSA. La réponse correspond au rapport de l'aire de l'isoforme ou de l'analogue analysé sur l'aire du standard interne Gb₃(d18:1)(C18:0)D3.

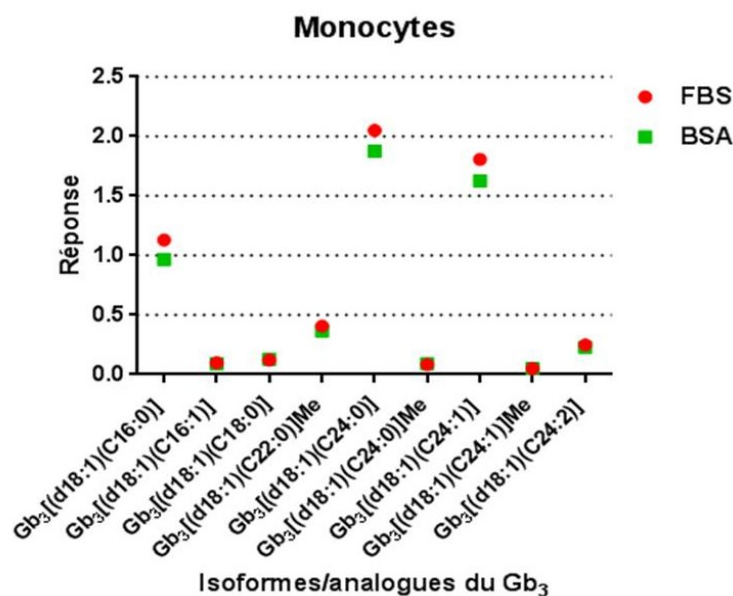


Figure 19. Comparaison de la réponse de certains isoformes et analogues du Gb₃, analysés en spectrométrie de masse en tandem à partir d'échantillons de lymphocytes B traités avec une solution tampon contenant 2.0% de FBS ou avec une solution tampon contenant 0.5% de BSA. La réponse était normalisée par le standard interne Gb₃(d18:1)(C18:0)D3.

Une autre problématique est survenue en ce qui a trait à l'isolation et la purification des lymphocytes B et des monocytes. Le premier essai a été fait avec la procédure de RosetteSep de Stemcell Technologies Inc. (Vancouver, BC, Canada). Brièvement, la séparation des lymphocytes B et des monocytes reposait sur une sélection négative des cellules. Pour y arriver, un cocktail d'anticorps permettait aux cellules non désirées de former des agrégats entre elles, puis en ajoutant une solution servant de gradient de densité et en centrifugeant l'échantillon, nous obtenions une séparation des cellules d'intérêt. De la phase supérieure vers la phase inférieure se trouvait quatre séparations soit respectivement le plasma, les cellules enrichies, soit les lymphocytes B ou les monocytes, le gradient de densité et finalement les agrégats de cellules non désirées. Ainsi en théorie, il était possible de récupérer la phase qui contenait seulement les cellules d'intérêt. En pratique, cette méthode utilisée n'était vraiment pas optimale pour une bonne pureté et une bonne récupération des cellules. Il était très difficile d'apercevoir la phase contenant les cellules d'intérêt dû au fait qu'elle était mince et mal définie (pas de scission nette), tous ces facteurs augmentaient la difficulté d'évaluer si toutes les cellules avaient bien été récupérées sans interférence. Des photographies sont disponibles à la Figure 20. Il a donc été nécessaire de se tourner vers une nouvelle approche.

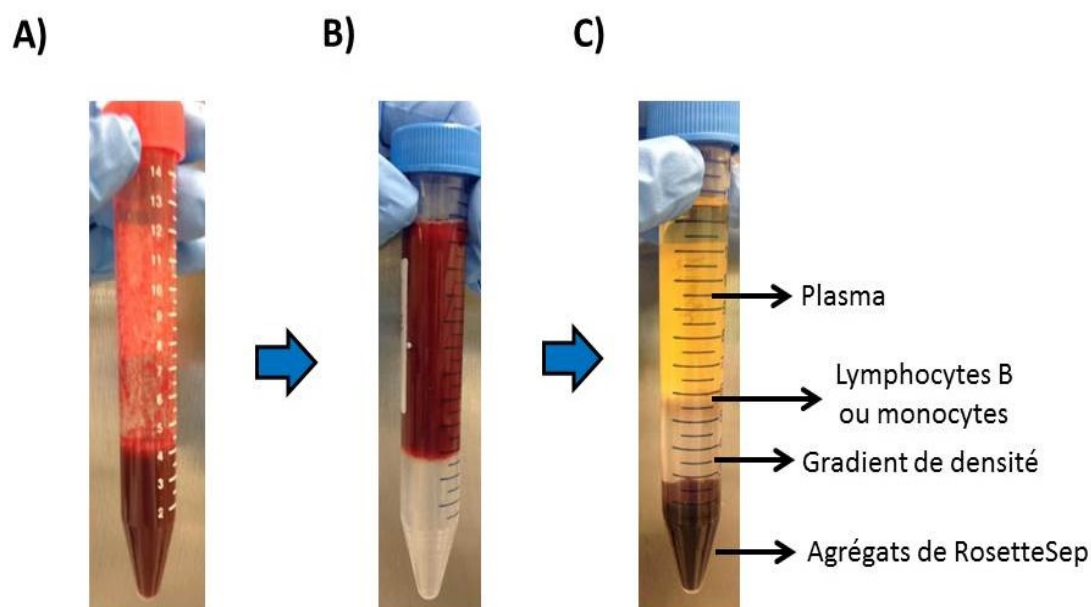


Figure 20. Résultats de l'isolation des lymphocytes B ou des monocytes avec la procédure RosetteSep: A) Ajout du cocktail d'anticorps de RosetteSep; B) Ajout du gradient de densité; C) Séparation des phases suite à la centrifugation de l'échantillon.

Le deuxième essai a été entrepris avec le principe d'EasySep, de Stemcell Technologies Inc (Vancouver, BC, Canada) où le principe repose sur une sélection positive des cellules par des anticorps. Afin de limiter la quantité d'anticorps nécessaires, le protocole d'isolation de ces cellules débute au moment où le culot de leucocytes a été obtenu sans être purifié. Ainsi, des anticorps spécifiques au CD19 et CD14 ont été utilisés afin de se lier spécifiquement soit aux lymphocytes B ou aux monocytes, respectivement. Nous avons ensuite ajouté les billes magnétiques qui se lient spécifiquement aux anticorps, en plaçant l'échantillon dans le support magnétique et en faisant plusieurs lavages avec la solution tampon, nous avons réussi à conserver uniquement les cellules ciblées avec un niveau de pureté supérieur à 97%.

1.8.4 Optimisation des paramètres

1.8.4.1 Optimisation de l'extraction du Gb₃

L'optimisation des paramètres d'extraction du Gb₃ peut se faire à plusieurs niveaux soit pour ce qui est de l'extraction elle-même du Gb₃ dans les cellules sanguines, pour établir les paramètres optimaux pour la chromatographie liquide ou bien pour la spectrométrie de masse en tandem. Pour ce qui est de l'extraction du Gb₃, il a été important d'optimiser les quantités d'hydroxyde de potassium (KOH) et d'acide acétique glacial ajoutées aux échantillons. En fait, l'ajout de KOH permet la saponification des triglycérides qui pourraient provoquer des effets de matrice. Les échantillons de leucocytes, de lymphocytes B et de monocytes ont donc été testés sans KOH, avec 450, 650, 850, 1000 et 1200 µL de KOH à 1 mM dans le méthanol. L'échantillon ayant reçu 850 µL de KOH a été celui qui a obtenu le signal le plus élevé en spectrométrie de masse, étant donné que l'ajout de différentes quantités de KOH est le seul paramètre à avoir été modifié lors de l'extraction. Il est donc possible d'attribuer cette augmentation de signal à l'ajout de la quantité adéquate de KOH, ce qui permettrait de réduire au maximum les effets de matrice dans les échantillons. La Figure 21 présente les chromatogrammes des échantillons avec ou sans l'ajout de KOH pour le Gb₃[(d18:1)(C17:0)]. La molécule de Gb₃[(d18:1)(C17:0)] ne se retrouve pas de manière endogène dans les cellules, cette molécule doit être synthétisée en laboratoire, ainsi la concentration ne varie pas en fonction des échantillons, elle varie seulement en fonction de la quantité injectée et cela était très avantageux pour évaluer l'effet de matrice. Afin de retrouver un pH entre 6 et 7, 50 µL d'acide acétique glacial ont été ajoutés à l'échantillon.

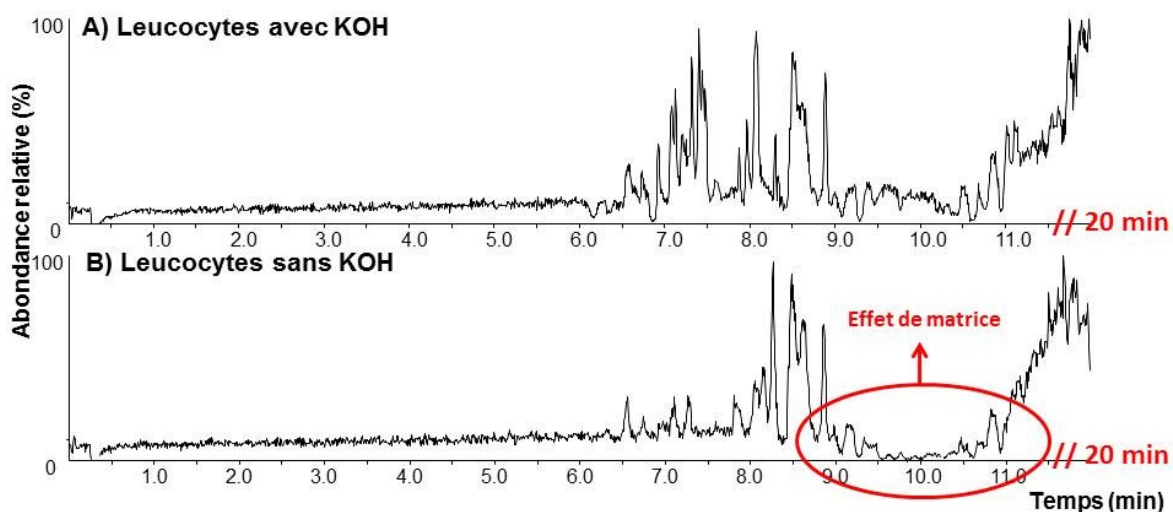


Figure 21. Résultats du test d'infusion continue de Gb₃[(d18:1)(C17:0)] combinée à l'injection d'échantillon de leucocytes afin de vérifier s'il y a présence d'effet de matrice : A) avec un ajout de 850 μ L de KOH; B) sans ajout de KOH.

1.8.4.2 Optimisation des paramètres de la chromatographie liquide

Des chromatographies liquides ultra performance avec différents gradients de phases mobiles, différentes durées, ainsi qu'à différents débits ont été testées afin d'obtenir un signal maximum pour les molécules d'intérêt tout en ayant des effets de matrice réduits autant que possible. La chromatographie retenue a une longue durée soit de 20 minutes, mais permet de bien séparer les molécules d'intérêt des interférents pour réduire l'effet de matrice. Elle a un débit de 0,5 mL/min avec un gradient qui débute à 50% de phase A pour augmenter de manière linéaire jusqu'à 100% afin d'éluer toutes les molécules et finalement, une stabilisation à 50% de phase A en vue de la prochaine injection. La Figure 22 présente des chromatogrammes avec différents gradients de phases mobiles, ce qui affecte le temps de rétention des molécules d'intérêts. La Figure 21 b) représente celle dont les paramètres ont été retenus pour ce projet.

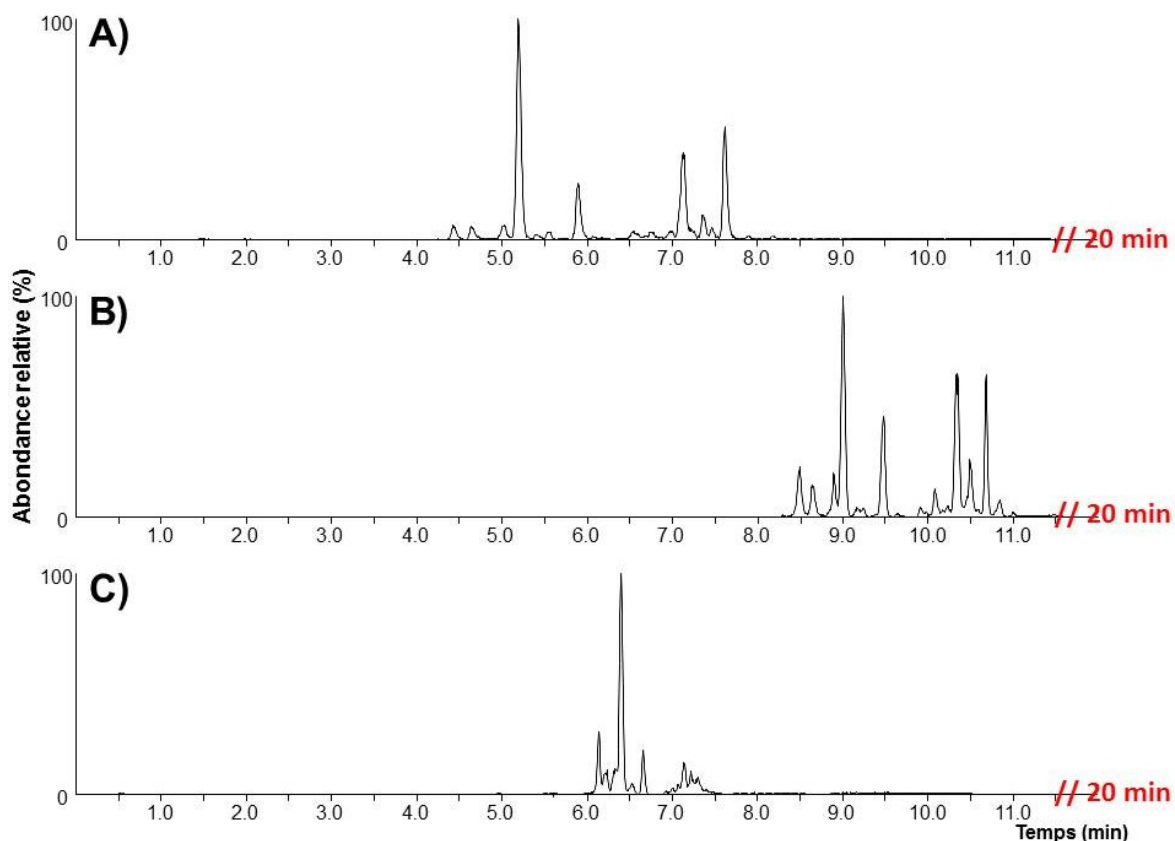


Figure 22. Impact de différents gradients ou de différents débits lors de la chromatographie liquide sur l'élution des molécules d'intérêt: A) chromatographie débutant à 75% de phase organique, augmentation linéaire jusqu'à 100% de phase organique et débit à 0.5 mL/min; B) chromatographie débutant à 50% de phase organique, augmentation linéaire jusqu'à 100% de phase organique et débit à 0.5 mL/min; et C) chromatographie débutant à 50% de phase organique, augmentation linéaire jusqu'à 100% de phase organique et débit à 0.25 mL/min.

La Figure 23 présente des chromatogrammes des isoformes/analogues spécifiques du Gb₃.

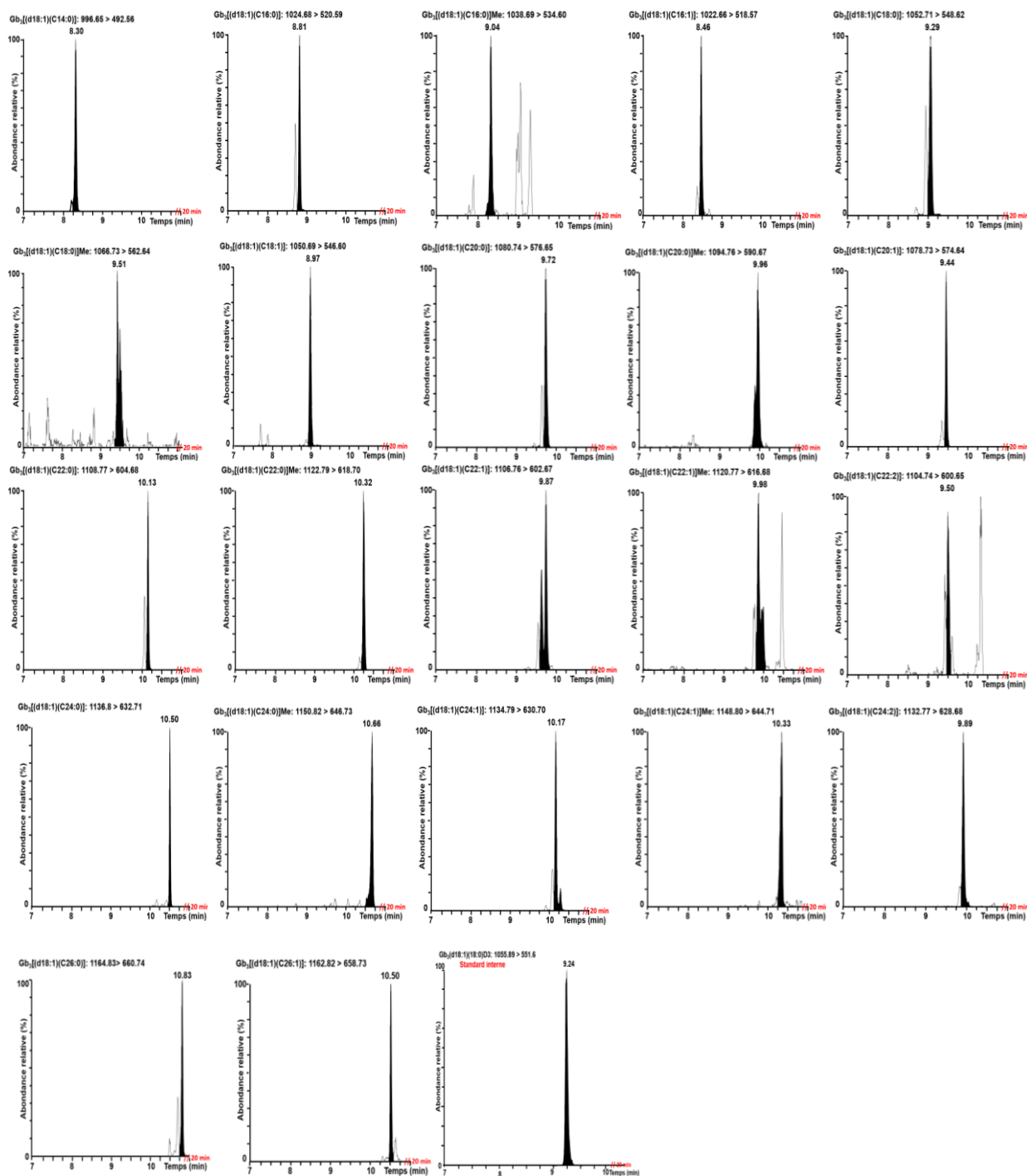


Figure 23. Chromatographie liquide des 22 isoformes et analogues du Gb₃ ainsi que le standard interne Gb₃[(d18:1)(C18:0)]D3

Pour vérifier les effets de matrice, les échantillons de cellules ont été analysés en même temps que l'infusion continue de Gb₃[(d18:1)(C17:0)]. De cette façon, il est possible de voir la variation du signal de Gb₃[(d18:1)(C17:0)] selon les effets de matrice causés par les

échantillons de types cellulaires, tels les leucocytes totaux, les lymphocytes B et les monocytes. Dans la chromatographie finale, il est possible de constater une zone entre 9 et 11 minutes où le signal de Gb₃[(d18:1)(C17:0)] est fortement diminué et il s'agit du moment où les biomarqueurs étudiés sont détectés. Étant donné que tous les biomarqueurs se situent dans la zone diminuée, cela ne pose pas de problèmes, il n'y aura donc pas de biais pour les molécules à l'étude. Les chromatogrammes des tests d'infusion continue pour les différents types cellulaires sont présentés à la Figure 24. Dans une situation où les biomarqueurs auraient été répartis entre les zones diminuées ou non diminuées, cela aurait pu causer un problème d'effet de matrice. La solution possible aurait alors été d'utiliser deux standards internes pour compenser ce phénomène.

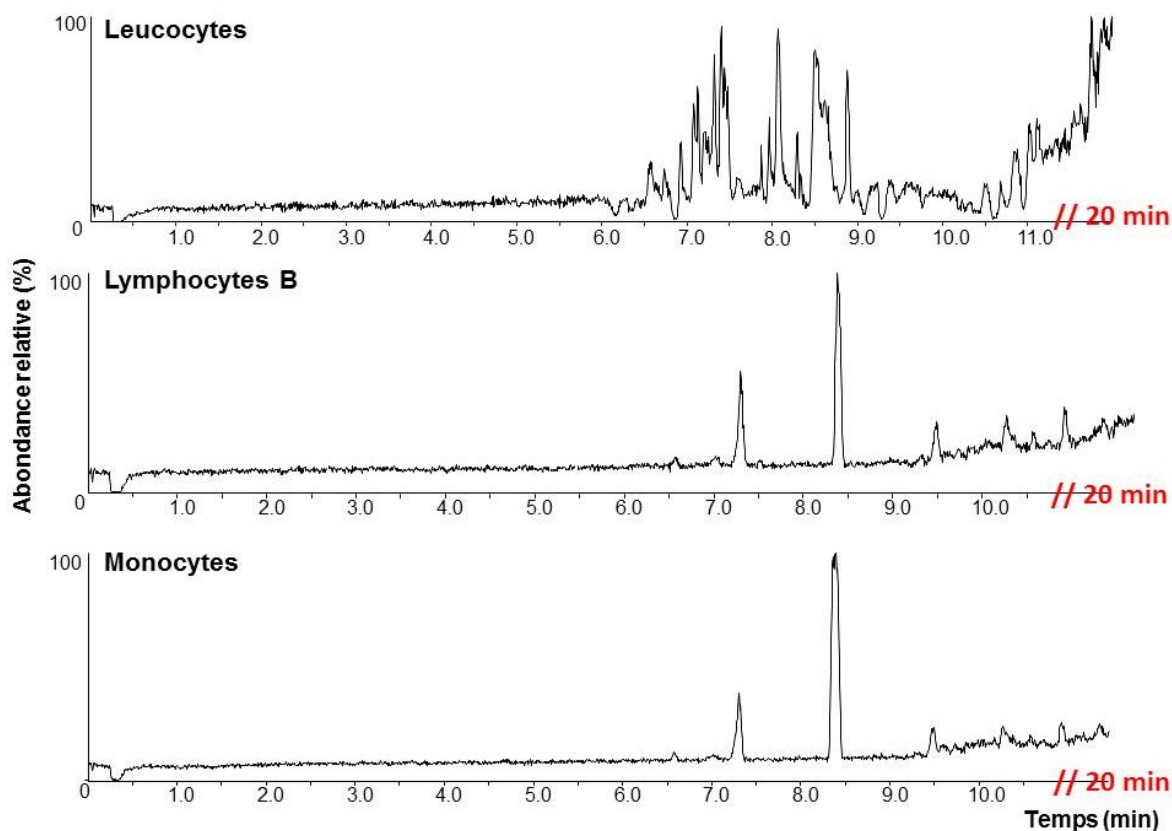


Figure 24. Résultats de l'infusion continue de Gb₃[(d18:1)(C17:0)] combinée à l'injection des échantillons afin de vérifier s'il y a présence d'effets de matrice : A) échantillon de leucocytes totaux; B) échantillon de lymphocytes B; et C) échantillon de monocytes.

L'optimisation de la colonne de chromatographie utilisée a également été nécessaire. Dans ce projet, trois colonnes ont été testées soit la BEH C8, la CSH C18 et la HSS T3 toutes de la compagnie Waters Corp. La colonne HSS T3 donnait un temps de rétention trop différent entre les biomarqueurs soit 3 minutes entre le premier biomarqueur et le dernier. Cela peut provoquer une différence au niveau des effets de matrice entre les biomarqueurs, ce qui n'est pas recommandé. Nous avons donc éliminé ce choix de colonne. Puis, les résultats obtenus étaient similaires pour les colonnes BEH C8 et CSH C18. Par contre, les chromatogrammes de la colonne BEH C8 permettaient une meilleure définition des pics avec une plus grande intensité du signal de ceux-ci. Nous avons donc retenu cette colonne pour la suite des analyses.

Puis, les spectres de fragmentation ont été analysés pour chacune des molécules afin de s'assurer d'attribuer les bons pics aux molécules quantifiées. Selon la fragmentation des molécules, il est possible de retrouver des fragments typiques des molécules analysées grâce aux masses exactes qui ont été mesurées par le spectromètre de masse en temps de vol, soit le Synapt (ESI-ToF-MS, Waters Corp.), couplé à un chromatographe liquide (UPLC). La Figure 25 présente un chromatogramme et des spectres de fragmentation pour la molécule Gb₃[(d18:1)(C16:0)].

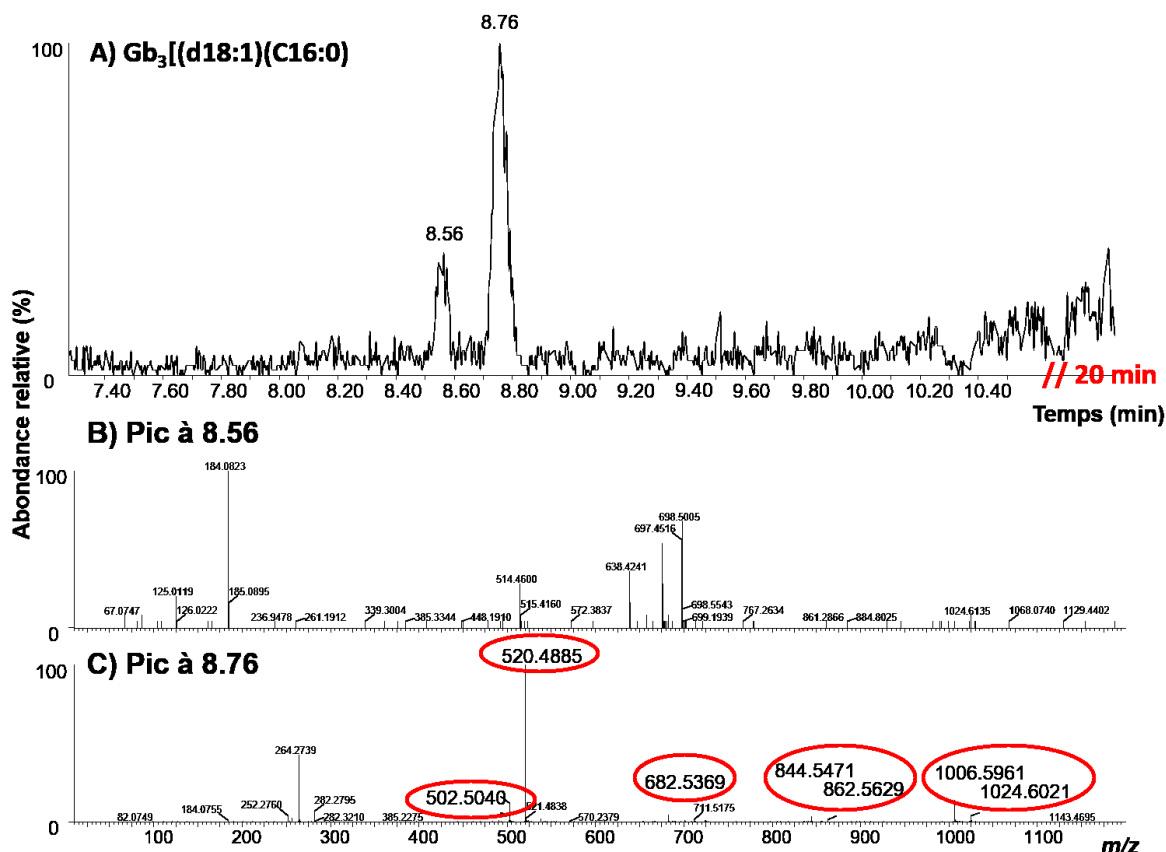


Figure 25. Résultats d'un chromatogramme et de spectres de fragmentation de la molécule $Gb_3[(d18:1)(C16:0)]$: A) Chromatogramme obtenu pour la molécule d'intérêt; B) Spectre de masse avec un pic interférent présent à 8.56 minutes; et C) Spectre de masse avec un pic de la molécule d'intérêt présent à 8.76 minutes identifié grâce au rapport m/z spécifique aux fragments de la molécule d'intérêt.

1.8.4.3 Optimisation des paramètres de la spectrométrie de masse

Pour l'optimisation des paramètres du spectromètre de masse en tandem, ceux-ci ont été optimisés de manière automatique par « Intellistart », soit une option possible avec le Xevo TQ-S (Waters Corp.) visant spécifiquement le $Gb_3[(d18:1)(C17:0)]$. Les principaux paramètres optimisés étaient principalement le voltage du capillaire, le voltage du cône, l'énergie de collision, la température de la source et la température de désolvatation. En comparant les résultats de l'analyse d'échantillons avec les paramètres de départ et ceux obtenus avec les nouveaux paramètres optimisés, nous pouvons conclure à une nette amélioration du signal des molécules grâce à l'optimisation. La Figure 26 présente l'appareil utilisé pour faire les analyses pour le projet soit le Xevo TQ-S couplé à un chromatographe

liquide ACQUITY I-CLASS. Les Figures 27 et 28 présentent les optimisations de certains paramètres du spectromètre de masse.



Figure 26. Spectromètre de masse en tandem de type Xevo TQ-S (à droite) couplé à un chromatographe liquide en ultra-performance de type ACQUITY UPLC I-CLASS (à gauche).

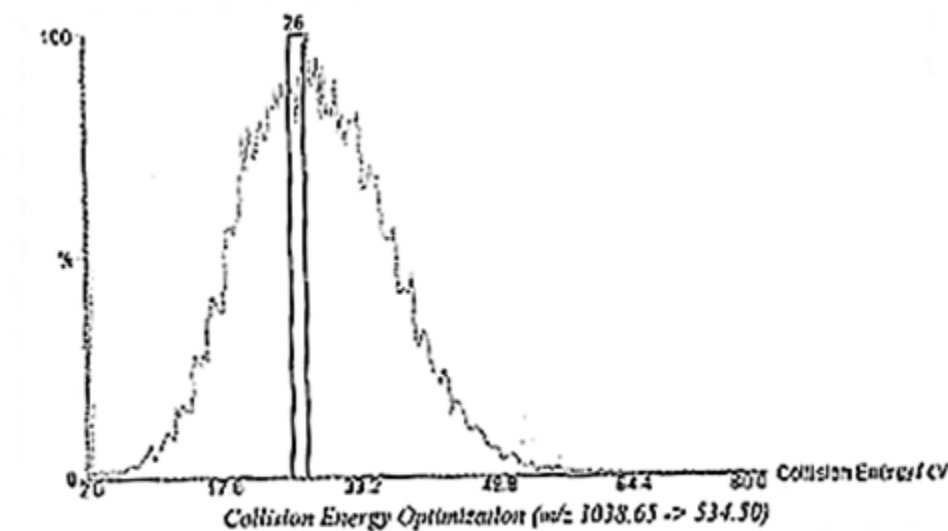


Figure 27. Optimisation de l'énergie de collision grâce à la fonction Intellistart du spectromètre de masse en tandem. Le résultat optimal a été atteint à 26 V.

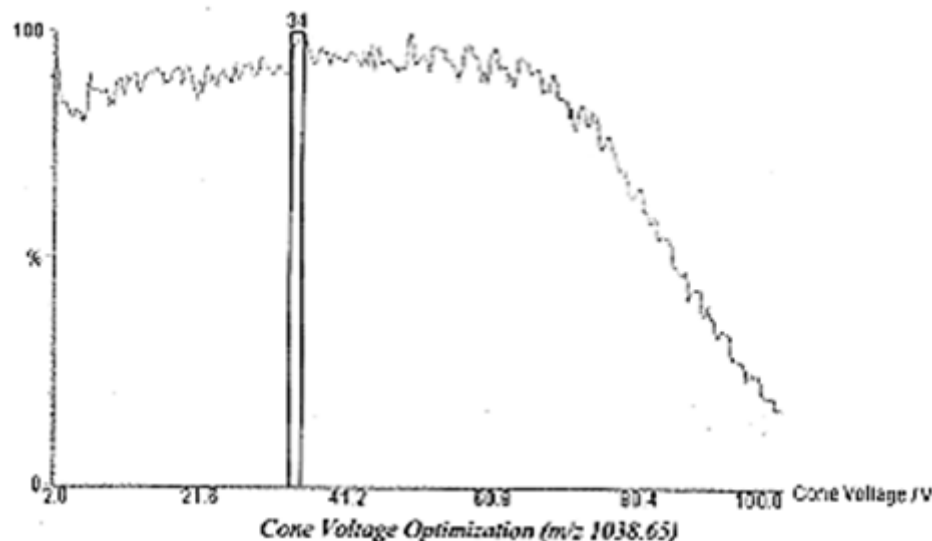


Figure 28. Optimisation du voltage du cône grâce à la fonction Intellistart du spectromètre de masse en tandem. Le résultat optimal a été atteint à 34 V.

1.8.5 Validation de la méthode

Lors du développement d'une méthode, il est important de valider plusieurs paramètres pour s'assurer de ne pas obtenir des résultats erronés. Les paramètres essentiels à être évalués sont présentés au Tableau 1.

Tableau 1. Paramètres à valider lors du développement d'une méthode

Critères	Description
Reproductibilité	Intrajour: Répétition des manipulations 5X dans la même journée Interjours: Répétition des manipulations 3X par jour pendant 5 jours
Recouvrement	Récupération du Gb ₃ lors de l'extraction
Évaluation des effets de matrice	Évaluation de la modification du signal dans la matrice des échantillons par rapport à l'eau
Limite de détection	10X Signal au bruit
Limite de quantification	3X Signal au bruit
Stabilité (temps et température)	Même concentration pour le sang traité immédiatement et 24 h après le prélèvement (conservé à température pièce) Même concentration pour les culots de cellules traitées immédiatement et après 4 semaines à -20°C
Cycles gel-dégel (3X)	Même concentration pour les culots non congelés et pour les culots ayant subi 3 cycles de gel-dégel
Adhésion au verre et au plastique	5X transferts des échantillons dans le verre 5X transferts des échantillons dans le plastique

D'abord, il est important de vérifier que la méthode ait une bonne reproductibilité, donc le résultat devrait être similaire si la méthode est répétée plusieurs fois durant la même journée, mais également si elle est répétée plusieurs fois au cours de différentes journées. Il est également important de connaître la proportion d'analytes récupérés grâce à la méthode. Puis, l'effet de matrice obtenu par la modification du signal est important à prendre en compte; il faut s'assurer que si différentes matrices sont comparées, qu'elles aient bien les mêmes effets de matrices diminués au maximum. Les limites de détection et de quantification doivent être connues afin de pouvoir mesurer précisément les concentrations d'analytes. La stabilité des échantillons à travers le temps, mais aussi à différentes températures est importante à considérer. Finalement, il faut s'assurer que les cycles de gel-dégel ou que les transferts dans le verre ou le plastique n'affecteront pas les concentrations d'échantillons. Les résultats de la validation sont présentés dans l'article, mais les Figures 29 et 30 présentent respectivement une photographie et un graphique démontrant la stabilité du sang affectée par la période de temps avant le traitement de l'échantillon. Il est clair d'après ces figures que l'échantillon de leucocytes totaux devait être isolé au moins 12 heures suite au prélèvement de sang pour éviter toute dégradation des isoformes/analogues du Gb₃

La validation fut réalisée sur les molécules sélectionnées provenant des différents groupes d'isoformes et analogues du Gb₃ soit le Gb₃[(d18:1)(C16:0)], Gb₃[(d18:1)(C22:0)], Gb₃[(d18:1)(C22:0)]Me, Gb₃[(d18:1)(C24:0)], Gb₃[(d18:1)(C24:1)]. Pour les leucocytes totaux, les lymphocytes B et les monocytes les coefficients de variation intrajours moyens étaient respectivement de 13.1% (8.7%-18.6%), 21.2% (19.0%-22.9%) et 13.5% (9.7%-22.7%). Les coefficients de variation des tests interjours moyens étaient respectivement 20.2% (15.8%-24.4%), 21.0% (20.1%-21.5%) et 22.1% (20.7%-23.5%).

Le recouvrement pour le total des leucocytes était entre 97-108% et pour les lymphocytes B et les monocytes, le recouvrement était entre 75-90%. L'effet de matrice était entre 2-17% pour le total des leucocytes et entre 5-11% pour les lymphocytes B et les monocytes.

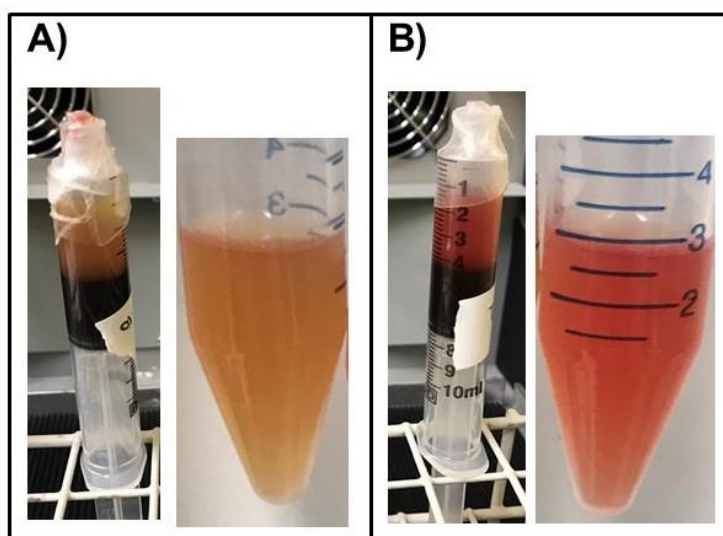


Figure 29. Isolation des leucocytes par la solution de dextran à 6% et récupération de la phase supérieure contenant le plasma et les leucocytes : A) leucocytes isolés 1 h après le prélèvement sanguin; B) leucocytes isolés 24 h après le prélèvement sanguin.

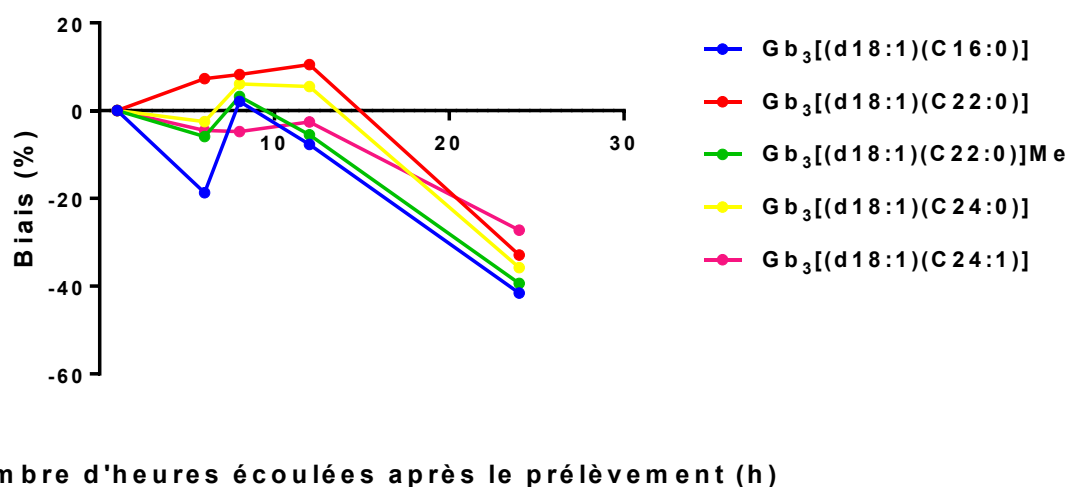


Figure 30. Résultats démontrant la stabilité de certains isoformes et analogues du Gb_3 présents dans le sang lorsque les leucocytes totaux sont isolés soit 1 h, 6 h, 8 h, 12 h ou 24 h après le prélèvement.

ARTICLE 1

Mass Spectrometry Analysis of Globotriaosylceramide (Gb₃) Isoforms/Analogues in Unfractionated Leukocytes, B Lymphocytes and Monocytes from Fabry Patients

Amanda Toupin, Pamela Lavoie, Marie-Françoise Arthus, Mona Abaoui, Michel Boutin, Carole Fortier, Claudia Ménard, Daniel G Bichet, Christiane Auray-Blais

Article soumis à *Analytica Chimica Acta*

Amanda Toupin a accompli le travail de laboratoire à l'origine de cet article. Elle a effectué toutes les étapes nécessaires au développement de la méthode de quantification présentée, ainsi que l'analyse des échantillons faisant partie de l'étude, sous l'étroite supervision des coauteurs du laboratoire d'accueil au Centre d'expertise en spectrométrie de masse Waters-CHUS à Sherbrooke. Elle a aussi travaillé pour l'isolation de certains échantillons de cellules sanguines au laboratoire de l'hôpital Sacré-Cœur sous la supervision des co-auteurs dudit hôpital. Avec l'aide des co-auteurs, elle a rédigé l'article pour lequel elle a procédé à l'analyse statistique et à la présentation des résultats sous forme de figures et de tableaux.

Résumé : La maladie de Fabry est une maladie de surcharge lysosomale liée au chromosome X marquée par une grande variabilité phénotypique et génotypique. Les glycosphingolipides comme le globotriaosylcéramide (Gb₃) et ses isoformes/analogues, le globotriaosylsphingosine (lyso-Gb₃) et ses analogues ainsi que le galabiosylcéramide (Ga₂) et ses isoformes/analogues peuvent s'accumuler dans les liquides biologiques et au niveau de différents organes. Les objectifs de l'étude étaient de: 1) développer/valider une nouvelle méthode UPLC-MS/MS pour la quantification relative du Gb₃ dans les leucocytes (fraction totale des cellules blanches), les lymphocytes B et les monocytes; 2) d'évaluer ces biomarqueurs dans une cohorte de patients atteints de la maladie de Fabry et de contrôles sains; et 3) d'établir des corrélations entre ces biomarqueurs, le traitement et le génotype. Des échantillons de sang complet, le plasma et l'urine ont été prélevés et analysés chez 21 patients atteints de la maladie de Fabry et chez 20 contrôles sains. Les échantillons ont été purifiés par une extraction liquide-liquide et ont été analysés par UPLC-MS/MS en électrobulisaison en mode positif. Des isoformes méthylés du Gb₃ ont été détectés démontrant que le processus de méthylation survient au niveau des cellules. Les résultats démontrent qu'il n'y avait pas de différences significatives dans la distribution des isoformes/analogues du Gb₃ dans les cellules sanguines entre les patients atteints de la maladie de Fabry et les contrôles sains. Dans les leucocytes totaux, la quantité relative des Gb₃[(d18:1)(C14:0)], Gb₃[(d18:1)(C16:0)], Gb₃[(d18:1)(C16:0)]Me, Gb₃[(d18:1)(C16:1)], Gb₃[(d18:1)(C18:0)], Gb₃[(d18:1)(C18:1)], Gb₃[(d18:1)(C20:1)], Gb₃[(d18:1)(C24:2)], Gb₃[(d18:1)(C26:1)] et le total du Gb₃ permet d'obtenir une bonne discrimination entre les hommes atteints de la maladie de Fabry et les hommes contrôles, puisque les patients ont une augmentation des biomarqueurs comparativement aux contrôles. Pour ce qui est des lymphocytes B et des monocytes, la même tendance a été observée, sans toutefois atteindre le niveau de significativité statistique. Une concordance positive entre les types de mutations et les niveaux de biomarqueurs dans les cellules sanguines a été établie. Ces résultats pourraient permettre une meilleure compréhension des processus biochimiques reliés à l'accumulation et la distribution des isoformes et analogues du Gb₃ dans les cellules blanches des patients atteints de la maladie de Fabry.

Mass Spectrometry Analysis of Globotriaosylceramide (Gb₃) Isoforms/Analogues in Leukocytes, B Lymphocytes and Monocytes from Fabry Patients

Amanda Toupin^a, Pamela Lavoie^a, Marie-Françoise Arthus^b, Mona Abaoui^a, Michel Boutin^a, Carole Fortier^b, Claudia Ménard^b, Daniel Bichet^{b,c}, Christiane Auray-Blais^{a*}

^a Division of Medical Genetics, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, CR-CHUS, Hospital Fleurimont, 3 001, 12th Avenue North, Sherbrooke, QC J1H 5N4

^b Hôpital Sacré-Coeur, Clinical Research Unit, and ^c Department of Medicine Pharmacology and Physiology, Université de Montréal, Montreal, QC H4J 1C5

***Corresponding author:** Christiane Auray-Blais, LL.M., Ph.D.

Tel.: +1 819 346 1110, ext. 14706; Fax: +1 819 564 5217.

E-mail: christiane.auray-blais@usherbrooke.ca

This manuscript was not presented elsewhere.

Disclaimer: No funding organization played a role in the design of study, interpretation of data, and preparation of this manuscript.

Abstract

Fabry disease is an X-linked lysosomal storage disorder with marked variability in the phenotype and genotype. Glycosphingolipids such as globotriaosylceramide (Gb₃) isoforms/analogues, globotriaosylsphingosine (lyso-Gb₃) and analogues, and galabiosylceramide (Ga₂) isoforms/analogues may accumulate in biological fluids and different organs. The aims of this study were to: 1) develop/validate a novel UPLC-MS/MS method for relative quantitation of Gb₃ in leukocytes (unfractionated white blood cells), B lymphocytes and monocytes; 2) evaluate these biomarkers in a cohort of Fabry patients and healthy controls; and 3) assess correlations between these biomarkers, treatment and genotype. Whole blood, plasma and urine samples from 21 Fabry patients and 20 healthy controls were analyzed. Samples were purified by liquid-liquid extraction and analyzed by UPLC-MS/MS in positive electrospray ionization. Methylated Gb₃ isoforms were detected, showing that a methylation process occurs at the cellular level. Our results show that there were no significant differences in the distribution of the different Gb₃ isoforms/analogues in blood cells between Fabry patients and healthy controls. In leukocyte, Gb₃[(d18:1)(C14:0)], Gb₃[(d18:1)(C16:0)], Gb₃[(d18:1)(C16:0)]Me, Gb₃[(d18:1)(C16:1)], Gb₃[(d18:1)(C18:0)], Gb₃[(d18:1)(C18:1)], Gb₃[(d18:1)(C20:1)], Gb₃[(d18:1)(C24:2)], Gb₃[(d18:1)(C26:1)] and total Gb₃ allowed good discrimination between male Fabry patients and male controls, patients having higher biomarker levels than controls. Regarding B lymphocytes and monocytes, the same tendency was observed without reaching statistical significance. A positive concordance between mutation types and biomarker levels in white blood cells was established. Our results might provide a **deeper** mechanistic comprehension **of the** underlying biochemical processes of Gb₃ biomarkers in white blood cells of Fabry patients.

Keywords

Fabry disease, Globotriaosylceramide (Gb₃), UPLC-MS/MS, Leukocytes, B Lymphocytes, Monocytes

Mass Spectrometry Analysis of Globotriaosylceramide (Gb₃) Isoforms/Analogues in Unfractionated Leukocytes, B Lymphocytes and Monocytes from Fabry Patients

Amanda Toupin^a, Pamela Lavoie^a, Marie-Françoise Arthus^b, Mona Abaoui^a, Michel Boutin^a, Carole Fortier^b, Claudia Ménard^b, Daniel G. Bichet^b, Christiane Auray-Blais^{a*}

^a Division of Medical Genetics, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, CR-CHUS, Hospital Fleurimont, 3,001, 12th Avenue North, Sherbrooke, QC J1H 5N4

^b Hôpital Sacré-Cœur, Clinical Research Unit, and ^c Department of Medicine Pharmacology and Physiology, Université de Montréal, Montreal, QC H4J 1C5

***Corresponding author:** Christiane Auray-Blais, LL.M., Ph.D.

Tel.: +1 819 346 1110, ext. 14706; Fax: +1 819 564 5217.

E-mail: christiane.auray-blais@usherbrooke.ca

This manuscript was not presented elsewhere.

Disclaimer: No funding organization played a role in the design of study, interpretation of data, and preparation of this manuscript.

Abstract

Fabry disease is an X-linked lysosomal storage disorder with marked variability in the phenotype and genotype. Glycosphingolipids such as globotriaosylceramide (Gb₃) isoforms/analogs, globotriaosylsphingosine (lyso-Gb₃) and analogs, and galabiosylceramide (Ga₂) isoforms/analogs may accumulate in biological fluids and different organs. The aims of this study were to: 1) develop/validate a novel UPLC-MS/MS method for relative quantitation of Gb₃ in leukocytes (unfractionated white blood cells), B lymphocytes and monocytes; 2) evaluate these biomarkers in a cohort of Fabry patients and healthy controls; and 3) assess correlations between these biomarkers, treatment and genotype. Whole blood, plasma and urine samples from 21 Fabry patients and 20 healthy controls were analyzed. Samples were purified by liquid-liquid extraction and analyzed by UPLC-MS/MS in positive electrospray ionization. Methylated Gb₃ isoforms were detected, showing that a methylation process occurs at the cellular level. Our results show that there were no significant differences in the distribution of the different Gb₃ isoforms/analogs in blood cells between Fabry patients and healthy controls. In leukocyte, Gb₃[(d18:1)(C14:0)], Gb₃[(d18:1)(C16:0)], Gb₃[(d18:1)(C16:0)]Me, Gb₃[(d18:1)(C16:1)], Gb₃[(d18:1)(C18:0)], Gb₃[(d18:1)(C18:1)], Gb₃[(d18:1)(C20:1)], Gb₃[(d18:1)(C24:2)], Gb₃[(d18:1)(C26:1)] and total Gb₃ allowed good discrimination between male Fabry patients and male controls, patients having higher biomarker levels than controls. Regarding B lymphocytes and monocytes, the same tendency was observed without reaching statistical significance. A positive concordance between mutation types and biomarker levels in white blood cells was established. Our results might provide a deeper **mechanistic comprehension** of the underlying biochemical processes of Gb₃ biomarkers in white blood cells of Fabry patients.

Keywords

Fabry disease, Globotriaosylceramide (Gb₃), UPLC-MS/MS, Leukocytes, B Lymphocytes, Monocytes

1. Introduction

Fabry disease (OMIM no. 301500) is an X-linked, panethnic, inborn error of metabolism caused by mutations of the gene *GLA* leading to α -galactosidase A (α -GAL A, EC 3.2.1.22) enzyme deficiency [1–4]. This multisystemic lysosomal storage disorder causes the accumulation of glycosphingolipids such as globotriaosylceramide (Gb₃) and related isoforms and analogs [5,6], globotriaosylsphingosine (lyso-Gb₃) and related analogs [7–11] and galabiosylceramide (Ga₂) and related isoforms and analogs [12]. Patients affected with classic Fabry disease develop early symptoms, such as acroparesthesia, hypohidrosis, angiokeratomas, gastrointestinal symptoms and psychosocial manifestations [13,14]. Older patients develop cardiac manifestations, including left ventricular hypertrophy, arrhythmia, ischemia, and mitral valve complications. Renal complications occur, which may lead to progressive renal impairment leading to dialysis. Neurological symptoms are also part of the clinical spectrum, as well as ocular manifestations such as cornea verticillata and corneal opacity [15–17]. Typically, Fabry males are more severely affected than females, although in some cases, females can be as severely affected as men [18,19]. The estimated incidence of Fabry disease is between 1/40,000 to 1/117,000 in the general population, but owing to the complexity of obtaining a final diagnosis of the disease, it is probably underestimated [20–22]. In Taipei, a newborn screening study showed that the incidence in the male population is approximately 1/1,600 with the specific cardiac late-onset mutation IVS4 + 919G → A [23,24]. This study suggests that Fabry disease is more prevalent in some populations than initially suspected.

Enzyme replacement therapy (ERT) is one of the treatments for Fabry disease [25,26]. There are currently two common ERTs, using recombinant enzymes: agalsidase alfa (Replagal®, Shire) and agalsidase beta (Fabrazyme®, Sanofi Genzyme), being infused at 0.2 mg/kg biweekly and 1 mg/kg biweekly, respectively. It has been established that ERT slows the progression and the severity of the disease [27–29]. Unfortunately, there were several cases where patients developed antibodies against the enzyme [30,31]. The benefits of ERT must be greater than the potential risks of secondary effects. In order to be eligible for treatment in Canada, patients must respect the indications of the Canadian Fabry Disease Initiative

guidelines [32,33]. Nonetheless, even among patients treated by ERT, there were cases with progression of the disease to premature death or organ failures [34].

The monitoring and follow up of patients by quantitation of Gb₃ is currently performed in urine and in plasma by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [6,7]. A method to analyze Gb₃ in urine collected on a filter paper was also developed to facilitate the transport and storage of samples [35]. The discovery of novel Gb₃ isoforms and analogs in urine of patients with Fabry disease was also done by our group using a metabolomic approach [36], and the analysis of Gb₃ isoforms and analogs is now routinely applied for follow up of patients [6]. Gb₃ isoforms are characterized by modifications on the fatty acid chain of the molecule and analogs by modifications on the sphingosine moiety. Gb₃ isoforms and analogs are divided into five groups: 1) Gb₃-related isoforms with saturated fatty acids; 2) Gb₃-related isoforms/analogues with one double bond; 3) Gb₃-related isoforms and analogues with two double bonds; 4) Gb₃-related analogues with a hydrated sphingosine; and 5) methylated Gb₃-related isoforms; [36,37]. Metabolomic studies also demonstrated the existence of lyso-Gb₃ and related analogues [8,11], and galabiosylceramide (Ga₂) with isoforms and analogues in Fabry patient urine samples [12,38]. Several other studies reported the quantitation of Gb₃, lyso-Gb₃ and Ga₂ in plasma [9,39].

In order to localize Gb₃ in different tissues, an immunohistological study was performed in biopsies, autopsies and cell cultures of Fabry patients treated by ERT [40]. Results of this study show an important heterogeneity in the distribution of Gb₃ between organs. Qualitative analysis of the staining demonstrated a significant concentration of Gb₃ in the heart and the kidneys. The subcellular immunohistology highlighted the accumulation of Gb₃ in lysosomes, as expected, but also in the nuclei, the endoplasmic reticulum and the cell membranes. Finally, the study demonstrated that even after five years of ERT treatment for patients, there was a considerable amount of Gb₃ in various cells and tissues [40]. This highlighted the urgent need to investigate the accumulation and distribution of Gb₃ in different organs and cell structures.

A previous study demonstrated the perturbations of the distribution of leukocyte subtypes in Fabry patient [41]. The authors quantified the leukocyte subpopulations by flow cytometric analysis and the intracellular Gb₃ was quantified using fluorescence of monoclonal Gb₃-specific-antibodies. Their results show that Fabry patients tend to have higher levels of lymphocytes and a lower concentration of monocytes. The lymphocytes of Fabry patients showed a significant increase of intracellular Gb₃ compared with controls [41]. These results demonstrate differences between Fabry patients and controls and show that the analysis of intracellular Gb₃ may lead to a better follow up of patients.

Regarding the quantitation of the five aforementioned groups of Gb₃ isoforms and analogs, we have developed and validated a tandem mass spectrometry methodology allowing their analysis in different tissues of NOD/SCID/Fabry mice [37]. These results show a high level of saturated Gb₃ isoforms compared to the other groups. Moreover, Gb₃ isoforms and analogs were particularly increased in the spleen compared to other organs which showed progressively decreasing levels in the small intestine, the kidneys, the lungs, the heart, the liver to the brain [37].

The main objectives of this study were thus to: 1) develop and validate a method by ultra-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) for the relative quantitation of Gb₃ and related isoforms and analogs in white blood cells (unfractionated leukocytes, B lymphocytes, and monocytes); 2) evaluate these biomarkers in a cohort of ERT-treated and non-ERT treated Fabry disease patients and healthy age- and sex-matched controls; and 3) assess correlations between these biomarkers and the treatment and genotype.

2. Materials and methods

2.1. Ethics approval

This project was approved by the Research Ethics Board (REB) of the Faculty of Medicine and Health Sciences of the Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke (CHUS) and the Hôpital du Sacré-Coeur de Montréal. Informed consents from all Fabry patients and healthy controls were obtained.

2.2. Urine, whole blood and plasma specimen collection

Blood and urine specimens were collected from 20 healthy controls and 21 patients who have been diagnosed with Fabry disease confirmed by the identification of a pathogenic mutation in the *GLA* gene.

Table 1 shows demographic data from the patients and control cohorts. Blood was collected with a 21 G butterfly needle in BD Vacutainer lithium heparin tubes to perform the cell isolation and in BD Vacutainer K2 EDTA for plasma isolation. The collected blood was always processed within 12 hours. Cell pellets, plasma, and urine samples were stored at -20°C until analysis. Fifty males and female plasma controls from different ethnic groups and with different age ranges (median: 48 years old; range 18-72 years old) were obtained from Bioreclamation in order to establish reference values in plasma Gb₃ (Hicksville, NY, USA).

Table 1

Demographic data of Fabry patient subgroups and healthy controls enrolled in this study. Treated Fabry patients were under ERT.

Subject subgroups	n	Age range (years)	Median (years)
Untreated Fabry males	4	24-37	29
Treated Fabry males	7	22-61	28
Control males	10	22-48	25
Untreated Fabry females	4	19-68	43
Treated Fabry females	6	48-69	58
Control females	10	25-67	42

2.3. Reagents

EasySep Human Glycophorin A Depletion Kit, EasySep Human CD19 Positive Selection Kit II, EasySep Human CD14 Positive Selection Kit II, and RoboSep Buffer 2 were from Stemcell Technologies Inc (Vancouver, BC, Canada). HPLC grade methanol (MeOH) was from EMD Chemicals Inc (Darmstadt, Germany). Chromasolv® Plus HPLC grade methyl tert-butyl ether (MTBE, 99.9%), dextran from leuconostoc mesenteroides, ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (EDTA) and sodium chloride were from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA). Optima® LC-MS grade water, ammonium

formate (Amm. Form, 99%) and potassium hydroxide (KOH) were from Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA). Formic acid (FA, 99 + %) was from Acros Organics (Morris Plains, NJ, USA). Glacial acetic acid was obtained from Millipore Corporation (Billerica, MA, USA). N-Octadecanoyl-D₃-ceramide trihexoside (Gb₃(d18:1)(C18:0)D₃) and ceramide trihexoside (Gb₃ with isoforms/analogues) were obtained from Matreya (State College, PA, USA).

2.4. Preparation of solutions

2.4.1. Differential sedimentation solution

A solution of 6% dextran, 0.9% saline and 1.5% EDTA was prepared resulting in a pH between 4 and 5. The solution is stable for one year at 4°C.

2.5. Sample preparation

2.5.1. Leukocyte isolation from whole blood

Leukocyte isolation was performed by collecting 4 mL of blood in a 10 mL syringe using a 21 G butterfly needle. The differential sedimentation solution was kept at room temperature 1 h before use and 1.25 mL of dextran 6% was added to the blood using a butterfly needle with the needle removed. A plastic paraffin film was used to cover the tip of the syringe's barrel and the blood was gently mixed by inversion. The syringe was incubated at 37°C for 1 h with the piston facing down. Following the incubation, another butterfly needle with the needle removed was used to transfer the supernatant slowly into a 15 mL polypropylene tube. The supernatant consists essentially of plasma and leukocytes. The supernatant was centrifuged for 5 minutes at 1,000 g and the cell pellet containing the leukocytes was retained for analysis.

2.5.2. Leukocyte purification from the cell pellet

The RoboSep Buffer 2 was kept at room temperature 1 h before use and 100 µL were used to resuspend the leukocyte pellet which was then transferred to a 5 mL polystyrene round-bottom tube. In order to eliminate residual red blood cells in leukocyte fractions, the protocol from the EasySep™ Human Glycophorin A Depletion kit was performed as described by

Stemcell (Vancouver, BC, Canada) with slight changes: the buffer used was the RoboSep Buffer 2 instead of the recommended medium which contains FBS (EasySep™ Buffer, RoboSep™ Buffer or PBS containing 2% fetal bovine serum (FBS) and 1 mM EDTA), 25 µL of the depletion cocktail antibodies (from the Stemcell kit), and 25 µL of magnetic particles which were also added to the sample. The purified leukocyte pellet was transferred to a 15 mL plastic tube and kept at -20°C until analysis.

2.5.3. B lymphocytes and monocyte isolation from leukocyte pellets

The non-purified unfractionated leukocyte pellet was used at the beginning of the protocol for the isolation of B lymphocytes and monocytes. The RoboSep Buffer 2 was maintained at room temperature 1 h before use and 100 µL was used to resuspend the leukocyte pellet which was then transferred to a 5 mL polystyrene round-bottom tube. The protocols from the EasySep™ Human CD19 Positive Selection Kit II and the EasySep™ Human CD14 Positive Selection Kit II were performed as described by Stemcell with slight changes: the buffer used was the RoboSep Buffer 2, 20 µL of the specific selection cocktail antibodies were added to bind with cells of interest and 20 µL of RapidSpheres were added to the samples to retain the antibody bound to these latter cells. The purified suspensions of B lymphocytes and monocytes were transferred to 15 mL plastic tubes and kept at -20°C until utilization.

2.5.4. Processing urine and plasma samples

The analysis of Gb₃ and lyso-Gb₃ was performed in plasma and urine samples as described previously [6,7,8,39].

2.5.5. Gb₃ extraction from cells

Isolated cells were thawed, deposited into a glass tube with a teflon-lined cap and evaporated under a nitrogen stream overnight. Then, 20 µL of the internal standard Gb₃(d18:1)(C18:0)D₃ 0.04 µg/µL was added to the samples followed by, 1.1 mL of MeOH, 5 mL of MTBE and 850 µL of KOH 1 mM in MeOH. The samples were then vortexed and incubated at 37°C for 1 h with a continued mixing movement. Fifty microliters of glacial acetic acid and 1.5 mL of H₂O were added. The samples were then vortexed, sonicated for 2 minutes, vortexed again and incubated at room temperature for 10 minutes. The upper organic phase layer was

collected and evaporated under a nitrogen stream until dryness. Finally, the samples were resuspended in 200 μ L of mobile phase A (MeOH/Amm. For. 5 mM/FA 0.1%).

2.6. Instrumentation and parameters

The analysis of Gb₃ isoforms and analogs, ceramide [(d18:1)(C16:0)] and the internal standard (Gb₃[(d18:1)(C18:0)D₃]) was performed using a multiplex methodology on a Xevo TQ-S (Waters Corp., Milford, MA) MS/MS combined to an Acquity I Class (Waters) UPLC system. An Acquity UPLC BEH C8 column (2.1 x 50 mm, 1.7 μ m particle size) with an on-line pre-filter (0.2 μ m) was used for the 20-minute chromatographic separation. In order to avoid the contamination of the mass spectrometer optics, to keep optimal conditions, as well as increase the time between instrument maintenance, we have redirected the last 5-min of the sample to waste. The electrospray ionization (ESI) was in positive mode and the signals were acquired during multiple reaction monitoring (MRM). The parameters of the ultra-performance liquid chromatography, the chromatography gradient used and the mass spectrometry parameters are shown in Table 2, Table 3, and Table 4, respectively.

Table 2

Ultra-performance liquid chromatography parameters for the relative quantitation of globotriaosylceramide isoforms/analogues in leukocytes, B lymphocytes and monocytes.

Parameters	Description
Column	Acquity UPLC BEH C8
Dimensions	2.1 mm x 50 mm (1.7 μ m particle size)
Column temperature	30°C
Injection mode	Partial loop with needle overfill
Injection volume	7.5 μ L
Autosampler temperature	10°C
Mobile phase A	MeOH + 5 mM Amm. Form. + 0.1% FA
Mobile phase B	H ₂ O + 5% MeOH + 5 mM Amm. Form. + 0.1% FA
Weak wash	50% phase A, 50% phase B
Strong wash	MeOH + 0.1% FA

Table 3

Ultra-performance liquid chromatography gradient for the relative quantitation of globotriaosylceramide isoforms/analogs in leukocytes, B lymphocytes and monocytes.

Time	Flow rate	Mobile phases (%)
0 → 1 min	0.5 mL/min	50 phase A
1 → 6 min	0.5 mL/min	50 → 80 phase A (linear)
6 → 12 min	0.5 mL/min	80 → 100 phase A (linear)
12 → 15 min	0.5 mL/min	100 phase A
15 → 16 min	0.5 mL/min	100 → 50 phase A
16 → 20 min	0.5 mL/min	50 phase A

Table 4

ESI-MS/MS parameters for the relative quantitation of globotriaosylceramide isoforms/analogs in leukocytes, B lymphocytes and monocytes.

Parameters	Description
Operating mode	Multiple reaction monitoring
Ionization mode	ESI+
Capillary voltage	2.50 kV
Source offset	50 V
Source temperature	150°C
Desolvation temperature	500°C
Cone gas flow	150 L/h
Desolvation gas flow	1000 L/h
Cone voltage	34 V
Collision energy	26 V

2.7. Normalization and quantitation of Gb₃

In order to quantify Gb₃ in leukocytes, B lymphocytes and monocytes, a Gb₃ internal standard (Gb₃[(d18:1)(C18:0)D₃]) was used to compensate for variations during the processing and sample analysis. The results are expressed using the response of the biomarkers. The response is defined by the peak area of the biomarker divided by the peak area of the internal standard.

2.8. Method validation

Validation was performed for each cellular type using healthy control samples. The following isoforms and analogs of different groups of Gb₃ were selected to validate the method: Gb₃[(d18:1)(C16:0)], Gb₃[(d18:1)(C22:0)], Gb₃[(d18:1)(C22:0)]Me, Gb₃[(d18:1)(C24:0)],

Gb₃[(d18:1)(C24:1)]. Considering that samples were from healthy controls, concentrated solution (10 mg/50 mL) and diluted solution (1.25 mg/50 mL) of a commercial pool of Gb₃ isoforms and analogs were spiked (75 µL) according to the different assays performed. These solutions were considered as high and low QCs, respectively.

Intraday (n = 3) and interday (n = 5) precision assays were performed in triplicates. The precision was evaluated by measuring the percentages of relative standard deviations (RSD) obtained for each response (area/internal standard area). For these intraday and interday assays, leukocytes were not spiked, because the samples from healthy controls were concentrated enough to be quantified, whereas for B lymphocytes and monocytes, samples were spiked with a low QC.

The recovery of Gb₃ was estimated by spiking samples before and after the liquid-liquid extraction. High QC was added to leukocytes and low QC was added for B lymphocytes and monocytes. The endogenous concentration of Gb₃ isoforms/analogs was subtracted from the concentration spiked. The recovery assays for Gb₃ were performed by comparing the areas of samples spiked at the end of the process with samples spiked at the beginning of the process.

Matrix effects were evaluated using samples diluted 1.5 fold. In order to confirm if the response remains the same without being influenced by a matrix effect, samples were injected into the mass spectrometer at the established volume of 7.5 µL, and at the volume of 5 µL. The comparison of the responses was evaluated by measuring the percentages of bias between the two volumes.

Limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) were defined as three and ten times the standard deviation of the analytes at low concentration (n = 5), respectively.

The stability of blood specimens was evaluated after storage for 1 h, 6 h, 8 h, 12 h and 24 h at room temperature without any treatment and leukocytes were afterwards isolated. The stability of the analytes after isolation of the unfractionated leukocytes was also evaluated

after storage for 4 weeks at -20 °C in quintuplicate for each cellular type, the leukocytes were spiked with a high QC and the B lymphocytes and monocytes were spiked with a low QC.

Adhesion of the analytes to glass and plastic was evaluated by making 4 consecutive transfers of extracted Gb₃ samples. Stability of Gb₃ measurements after three freeze-thaw cycles was tested for each cellular type. The leukocytes were spiked with a high QC and the B lymphocytes and monocytes were spiked with a low QC.

2.9. Statistical analysis

The statistical analyses were performed by IBM SPSS version 23. Graphics, and Benjamini and Hochberg *p*-value corrections [42] were performed by Graphpad software version 7 (La Jolla, CA, USA). Correlations between biomarker levels and treatment for each matrix were established by the Mann-Whitney U Test. Statistical significance was established at a *p*-value < 0.05 for all comparisons. For each test, *p*-values were adjusted using the Benjamini and Hochberg procedure for multiple comparisons. The correlations between biomarker levels in blood cells with other matrices were evaluated by the Spearman rank correlation coefficient. The outliers from the healthy control cohort were removed from the analyses according to the ROUT method in Graphpad [43].

3. Results

3.1. Fabry patient subgroups reported signs and symptoms

The signs and symptoms were analyzed for each recruited patient according to their medical records, as reported in Table 5. Four groups of symptoms are shown as established by the Mainz Severity Score Index (MSSI) classification [44] and all patient data are available in Supplementary file 1. Briefly, the percentages of general signs/symptoms obtained from the untreated Fabry males, the ERT-treated Fabry males, the untreated Fabry females and the ERT-treated Fabry females were 75.0%, 100.0%, 83.3% and 100.0%, respectively. For the neurological signs/symptoms the percentages were 75.0%, 100.0%, 83.3% and 75.0%, respectively, for the same groups. For the cardiovascular signs/symptoms the percentages

were 75.0%, 28.6%, 66.7% and 100.0%, respectively. For the renal signs/symptoms the percentages were 75.0%, 42.9%, 33.3% and 25.0%, respectively.

Table 5

Number of patients affected with different signs and symptoms in the Fabry cohorts classified into four categories (general, neurological, cardiovascular and renal) as per the Mainz Severity Score Index classification. LVH: left ventricular hypertrophy; ECG: electrocardiogram.

	Untreated Fabry males (n = 4)	ERT-Treated Fabry males (n = 7)	Untreated Fabry females (n = 6)	ERT-Treated Fabry females (n = 4)
General signs/symptoms				
Characteristic facial appearance	0	0	1	0
Angiokeratomas	3	6	3	3
Musculoskeletal	0	0	0	3
Cornea verticillata	2	5	3	4
Hypohidrosis or anhidrosis	2	6	0	0
Abdominal pain	0	5	5	2
Pulmonary (asthma and dyspnea)	1	2	1	2
Neurological signs/symptoms				
Tinnitus	2	4	2	2
Acroparesthesia	3	5	3	2
Cerebrovascular	0	0	2	0
Fatigue	0	2	0	2
Cardiovascular signs/symptoms				
LVH seen in ECG	2	1	3	2
Valve insufficiency	0	0	0	2
ECG abnormalities	1	2	3	4
Pacemaker	0	0	0	1
Hypertension	0	1	1	1
Renal signs/symptoms				
Proteinuria	3	3	2	1
Classification of patients by groups of signs/symptoms				
General	3 (75.0%)	7 (100.0%)	5 (83.3%)	4 (100.0%)
Neurological	3 (75.0%)	7(100.0%)	5 (83.3%)	3 (75.0%)
Cardiovascular	3 (75.0%)	2 (28.6%)	4 (66.7%)	4 (100.0%)
Renal	3 (75.0%)	3 (42.9%)	2 (33.3%)	1 (25.0%)

3.2. Method validation

The precision of the method was evaluated with intraday (n = 3) and interday (n = 5) assays, all these data are available in Supplementary file 2 to 4. For unfractionated leukocytes, B lymphocytes and monocytes, the RSDs for the intraday assays, have a mean value of 13.1% (range of 8.7%-18.6%), 21.2% (range: 19.0%-22.9%) and 13.5% (range: 9.7%-22.7%), respectively. For the interday assays, the CVs have a mean value of 20.2% (range: 15.8%-24.4%), 21.0% (range: 20.1%-21.5%) and 22.1% (range: 20.7%-23.5%), respectively.

The recovery of Gb₃ isoforms/analogs after the processing of samples were between 97%-108% for leukocytes and between 75%-90% for B lymphocytes and monocytes.

The matrix effects were between 2%-17% for leukocytes and between 5%-11% for B lymphocytes and monocytes.

The LOD and LOQ were evaluated for all the biomarkers in each cell types (Data available in Supplementary file 5).

If unprocessed, whole blood samples were stable at room temperature for 12 h, with a bias < 15%. The analytes were stable in cell pellets for four weeks at -20 °C for leukocytes with biases within the percentage of RSD established for the interday assay, so there were no signs of degradation. For B lymphocytes and monocytes there were no significant variations within four weeks if compared with the interday assay variations.

Gb₃ isoform/analog profiles in all cell types were stable after three freeze/thaw cycles. There were no signs of loss due to adhesion to plastic or glass after 4 transfers with biases < 5%.

3.3. Biomarker levels in unfractionated leukocytes

Fabry patients were separated into four groups: untreated Fabry males, ERT-treated Fabry males, untreated Fabry females and ERT-treated Fabry females (Data for each patient are available in Supplementary file 6). Table 6 shows the distribution in leukocytes of four groups of Gb₃ isoforms/analogs. It is noteworthy that the distributions are similar in all Fabry patient subgroups and healthy controls. The average percentages of saturated Gb₃,

unsaturated Gb₃ with one double bond, unsaturated Gb₃ with two double bonds and methylated Gb₃ were 63.4%, 26.8%, 4.6% and 5.2%, respectively. The more abundant isoforms/analogs were Gb₃[(d18:1)(C16:0)], Gb₃[(d18:1)(C22:0)], Gb₃[(d18:1)(C22:0)]Me, Gb₃[(d18:1)(C24:0)], Gb₃[(d18:1)(C24:1)]. For the individual Gb₃ isoform/analog distribution, ERT-treated Fabry patients and healthy controls were similar, but untreated Fabry patients were different from the rest of the cohorts though the differences did not reach statistical significance according to the Mann-Whitney U test (Figure 1). All the data are available in Supplementary file 7.

Table 6

Distribution in percentages of four different Gb₃ groups of saturated, unsaturated with one double bond, unsaturated with two double bonds and methylated in unfractionated leucocytes from Fabry patient subgroups and healthy controls.

Gb ₃ groups	Untreated Fabry males (n = 4)	ERT-Treated Fabry males (n = 7)	Control males (n = 10)	Untreated Fabry females (n = 6)	ERT-Treated Fabry females (n = 4)	Control females (n = 10)
Saturated	67.5%	64.2%	62.9%	61.1%	62.1%	62.7%
Unsaturated with one double bond	25.1%	26.5%	27.3%	27.3%	27.5%	27.2%
Unsaturated with two double bonds	3.4%	4.6%	4.8%	5.2%	4.8%	4.7%
Methylated	4.0%	4.7%	5.1%	6.4%	5.6%	5.5%

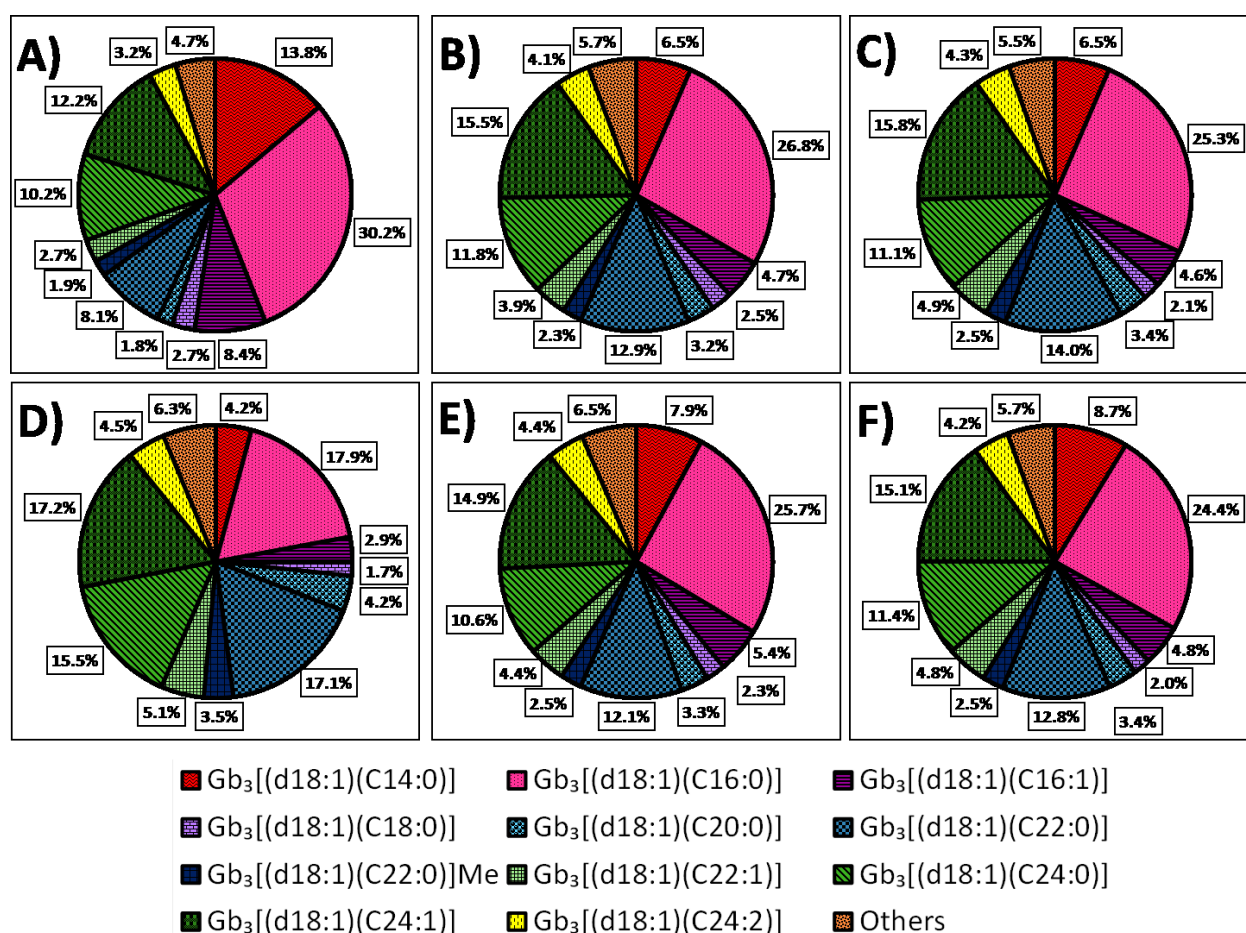


Fig. 1. Distribution of Gb_3 isoforms/analogs in unfractionated leukocytes for: (A) untreated Fabry males (UFM) (n = 4); (B) ERT-treated Fabry males (TFM) (n = 7); (C) healthy control males (CM) (n = 10); (D) untreated Fabry females (UFF) (n = 6); (E) ERT-treated Fabry females (TFF) (n = 4); (F) healthy control females (CF) (n = 10). The section “Others” includes the following less abundant isoforms/analogs: $\text{Gb}_3[(\text{d}18:1)(\text{C}16:0)]\text{Me}$, $\text{Gb}_3[(\text{d}18:1)(\text{C}18:0)]\text{Me}$, $\text{Gb}_3[(\text{d}18:1)(\text{C}18:1)]$, $\text{Gb}_3[(\text{d}18:1)(\text{C}20:0)]\text{Me}$, $\text{Gb}_3[(\text{d}18:1)(\text{C}20:1)]$, $\text{Gb}_3[(\text{d}18:1)(\text{C}22:1)]\text{Me}$, $\text{Gb}_3[(\text{d}18:1)(\text{C}22:2)]$, $\text{Gb}_3[(\text{d}18:1)(\text{C}24:0)]\text{Me}$, $\text{Gb}_3[(\text{d}18:1)(\text{C}24:1)]\text{Me}$, $\text{Gb}_3[(\text{d}18:1)(\text{C}26:0)]$, $\text{Gb}_3[(\text{d}18:1)(\text{C}26:1)]$.

For Gb_3 isoform/analog abundances, the male cohorts show a tendency for the majority of these biomarkers to be higher in the untreated and ERT-treated Fabry patients compared to healthy controls. There were no significant differences between untreated Fabry patients and healthy controls after the Benjamini and Hochberg *p*-value corrections for multiple

comparisons were applied. Treated patients were higher than healthy controls for all isoforms/analogs of Gb₃ and even after the *p*-value corrections, there were significant differences, for Gb₃[(d18:1)(C14:0)], Gb₃[(d18:1)(C16:0)], Gb₃[(d18:1)(C16:0)]Me, Gb₃[(d18:1)(C16:1)], Gb₃[(d18:1)(C18:0)], Gb₃[(d18:1)(C18:1)], Gb₃[(d18:1)(C20:0)]Me, Gb₃[(d18:1)(C24:0)], Gb₃[(d18:1)(C24:0)]Me, Gb₃[(d18:1)(C24:1)], Gb₃[(d18:1)(C24:1)]Me, Gb₃[(d18:1)(C24:2)], Gb₃[(d18:1)(C26:0)], Gb₃[(d18:1)(C26:1)] and for total Gb₃. For female cohorts, there was a tendency for untreated and ERT-treated Fabry patients to be higher than healthy controls without any significant differences. It is important to note that the large interquartile range for untreated Fabry males leads to less or no significant differentiations with the healthy controls compared with ERT-treated Fabry males which represent a more homogenous group with a greater number of patients (*n* = 7). The large variation might be caused by the small number of patients (*n* = 4) and by a cardiac mutation in one of these patients, which is associated with less accumulation of Gb₃ in the matrix. The results from the Mann-Whitney U test are shown in Table 7, an abbreviated form of the graphics of Gb₃ isoform/analog abundances are shown in Figure 2 and all the graphics are available in Supplementary file 8.

Table 7

Differences expressed by *p*-values in Gb₃ accumulation in unfractionated leukocytes for each isoform/analog between Fabry patient subgroups and healthy gender-matched controls. *: indicates a statistically significant difference; †: indicates that statistical significance was still valid after the Benjamini and Hochberg corrections for multiple comparisons (24 comparisons).

Gb ₃ isoforms/analog	Untreated Fabry males (n = 4)	ERT-Treated Fabry males (n = 7)	Untreated Fabry females (n = 6)	ERT-Treated Fabry females (n = 4)
Gb ₃ [(d18:1)(C14:0)]	0.020*	0.012*†	0.394	0.257
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]	0.106	0.001*†	0.041*	0.038*
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]Me	0.076	0.001*†	0.004*	0.038*
Gb ₃ [(d18:1)(C16:1)]	0.020*	0.001*†	0.240	0.114
Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)]	0.106	0.000*†	0.093	0.171
Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)]Me	0.940	0.091	0.041*	0.171
Gb ₃ [(d18:1)(C18:1)]	0.106	0.003*†	0.041*	0.019
Gb ₃ [(d18:1)(C20:0)]	0.414	0.114	0.093	0.610
Gb ₃ [(d18:1)(C20:1)]	0.710	0.055	0.041*	0.257
Gb ₃ [(d18:1)(C20:0)]Me	0.199	0.000*†	0.041*	0.171
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]	0.414	0.210	0.240	0.762
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]Me	1.000	0.055	0.009*	0.762
Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)]	0.199	0.055	0.180	0.610
Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)]Me	0.710	0.091	0.065	0.257
Gb ₃ [(d18:1)(C22:2)]	0.710	0.012*†	0.065	0.171
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]	0.940	0.023*†	0.093	0.762
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]Me	0.503	0.016*†	0.026*	0.257
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]	0.825	0.002*†	0.041*	0.160
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]Me	0.710	0.003*†	0.026*	0.257
Gb ₃ [(d18:1)(C24:2)]	0.825	0.000*†	0.041*	0.171
Gb ₃ [(d18:1)(C26:0)]	0.503	0.012*†	0.065	0.610
Gb ₃ [(d18:1)(C26:1)]	0.710	0.001*†	0.132	0.762
Ceramide [(d18:1)(C16:0)]	0.260	0.837	0.485	0.352
Total Gb₃	0.148	0.000*†	0.065	0.257

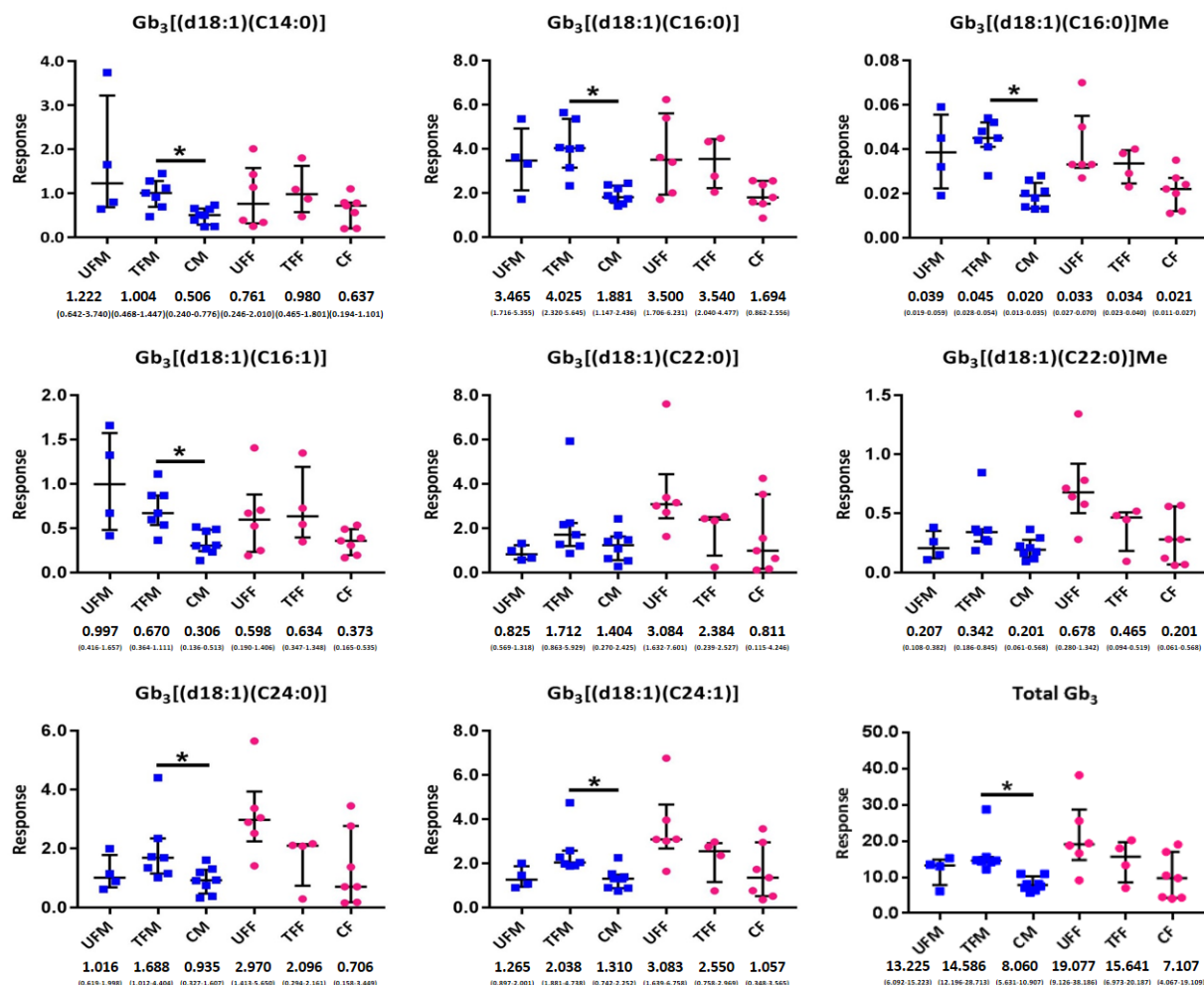


Fig. 2. Gb₃ isoform/analogue abundances expressed by the response (area/internal standard area) in leukocytes of untreated Fabry males (UFM) (n = 4), ERT-treated Fabry males (TFM) (n = 7), healthy controls males (CM) (n = 10), untreated Fabry females (UFF) (n = 6), ERT-treated Fabry females (TFF) (n = 4) and healthy control females (CF) (n = 10). Graphics are presented as the median with interquartile range. Males are represented by the blue square symbol “■” and females by the pink round symbol “●”. Asterisks (*) represent significant differences between the groups. At the bottom of the graphics, the median is presented, along with the minimum and maximum values for the specific group.

3.4. Biomarker levels in B lymphocytes

Fabry patients were separated into the same four groups as previously described and data for each patient are available in Supplementary file 9. The distributions of the four Gb₃ groups in B lymphocytes were similar in all Fabry patient subgroups and healthy controls. The average percentage of saturated Gb₃, unsaturated Gb₃ with one double bond, unsaturated Gb₃ with two double bonds and methylated Gb₃ were 59.9%, 21.7%, 4.1% and 14.2%, respectively, (Data shown in Table 8). The most abundant isoforms/analogs were Gb₃[(d18:1)(C16:0)], Gb₃[(d18:1)(C22:0)], Gb₃[(d18:1)(C24:0)] and Gb₃[(d18:1)(C24:1)]. There were no significant differences in the distribution of Gb₃ biomarkers between Fabry patient subgroups and healthy controls. These data are presented in part in Figure 3 and all the data are available in Supplementary file 10.

In comparison with the unfractionated leukocytes, our results show an interesting difference in the Gb₃ group distribution. In fact, for the Gb₃ methylated group there was an average of 5.2% in leukocytes, compared to 14.2% in B lymphocytes. This indicates that not all the blood cells have the same distribution of Gb₃ suggesting a possible difference in the metabolic pathway. Moreover, in B lymphocytes, the Gb₃[(d18:1)(C16:0)]Me represented approximately 8.3% of total Gb₃ isoform/analog analyses, whereas in leukocytes this molecule represented less than 2.0% of total Gb₃ isoforms/analogs. We also noticed that Gb₃[(d18:1)(C14:0)] was less abundant in B lymphocytes and monocytes (< 2%), whereas a higher percentage (14%) was found in unfractionated leukocytes of untreated Fabry males (see Fig. 1).

Table 8

Distribution of four Gb₃ groups (saturated, unsaturated with one double bond, unsaturated with two double bonds and methylated) in B lymphocytes from Fabry patient subgroups and healthy controls.

	Untreated Fabry males (n = 4)	ERT-Treated Fabry males (n = 7)	Control males (n = 10)	Untreated Fabry females (n = 6)	ERT-Treated Fabry females (n = 4)	Control females (n = 10)
Saturated	61.2%	59.8%	58.3%	60.9%	58.6%	60.3%
Unsaturated with one double bond	20.3%	22.0%	22.3%	22.2%	21.5%	22.0%
Unsaturated with two double bonds	4.5%	3.5%	3.8%	3.8%	4.9%	3.8%
Methylated	14.1%	14.6%	14.4%	13.1%	15.0%	13.9%

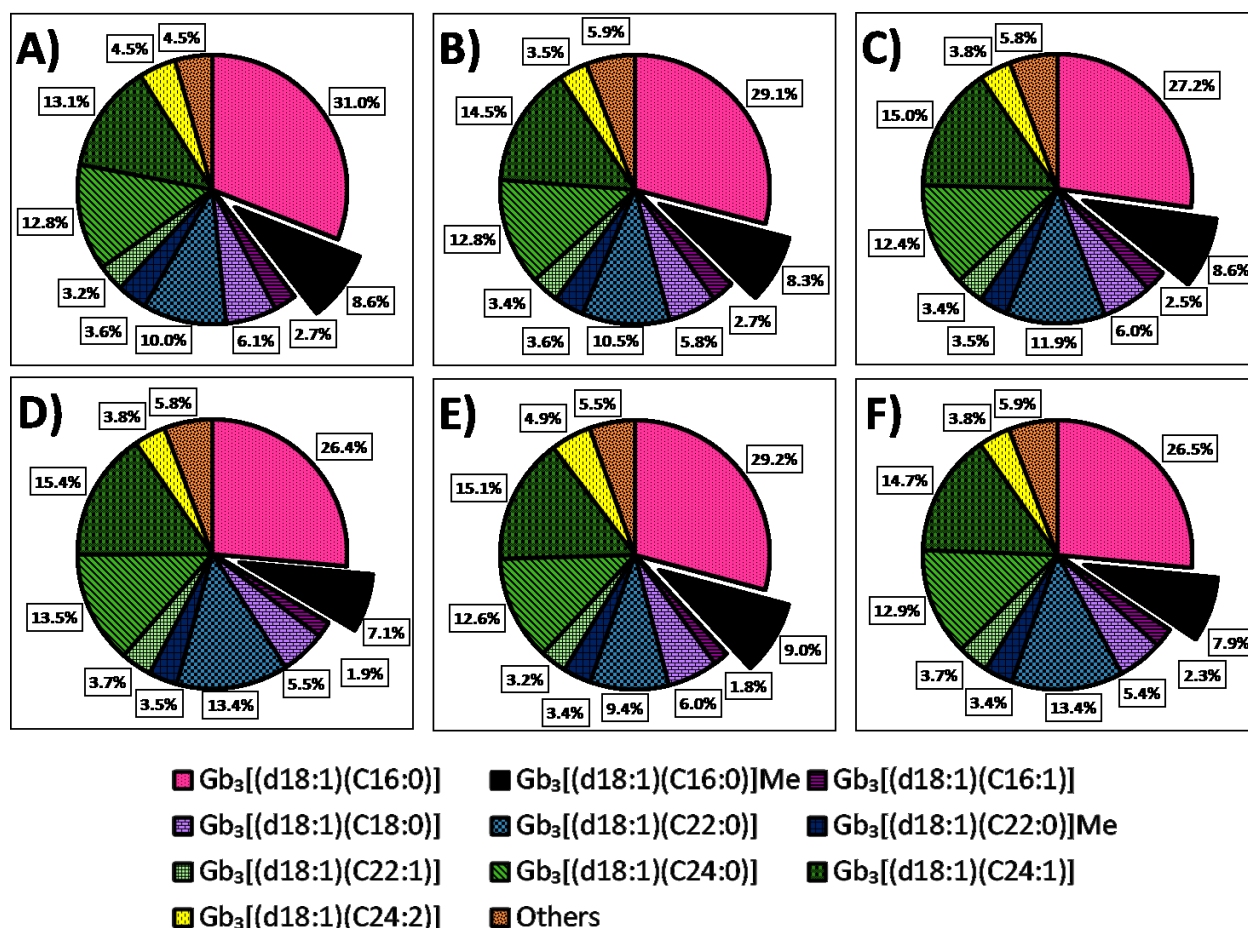


Fig. 3. Distribution of Gb₃ isoforms/analogs in B lymphocytes in: (A) untreated Fabry males (n = 4); (B) ERT-treated Fabry males (n = 7); (C) healthy control males (n = 10); (D) untreated Fabry females (n = 6); (E) ERT-treated Fabry females (n = 4); (F) healthy control females (n = 10). The section “Others” includes the following less abundant isoforms/analogs: Gb₃[(d18:1)(C14:0)], Gb₃[(d18:1)(C18:0)]Me, Gb₃[(d18:1)(C18:1)], Gb₃[(d18:1)(C20:0)], Gb₃[(d18:1)(C20:0)]Me, Gb₃[(d18:1)(C20:1)], Gb₃[(d18:1)(C22:1)]Me, Gb₃[(d18:1)(C22:2)], Gb₃[(d18:1)(C24:0)]Me, Gb₃[(d18:1)(C24:1)]Me, Gb₃[(d18:1)(C26:0)], Gb₃[(d18:1)(C26:1)].

For Gb₃ abundances in male cohorts, there were no tendencies for isoforms/analogs of Gb₃ to be higher either in untreated or ERT-treated Fabry patients or in healthy controls. For female cohorts, there was a slight tendency for the most abundant isoforms/analogs of Gb₃ to be higher for untreated Fabry patients than for healthy controls, but for ERT-treated Fabry patients, Gb₃ was lower than in healthy controls. There were no significant differences after

the *p*-value corrections between the groups. Results from the Mann-Whitney U test are shown in Table 9, an abbreviated form of the graphics of Gb₃ isoforms/analogs abundance are shown in Figure 4 and all the graphics are available in Supplementary file 11.

An interesting observation is that the ceramide [(d18:1)(C16:0)] was first analyzed in every blood cell sample in order to normalize the number of cells, but it turned out not to be an efficient way for the standardization. We found an interesting elevation of ceramide in B lymphocytes of the four subgroups of Fabry patients. There was a strongly significant difference between the ceramide levels in untreated Fabry males compared to healthy control males.

Table 9

Differences expressed by *p*-values in B lymphocyte Gb₃ accumulation between Fabry patient subgroups and sex-matched healthy controls. *: indicates a statistically significant result; †: indicates that statistical significance was still valid after the Benjamini and Hochberg corrections for multiple comparisons (24 comparisons).

	Untreated Fabry males (n = 4)	ERT-Treated Fabry males (n = 7)	Untreated Fabry females (n = 6)	ERT-Treated Fabry females (n = 4)
Gb ₃ [(d18:1)(C14:0)]	0.851	0.791	1.000	1.000
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]	0.280	0.211	0.050*	0.940
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]Me	0.343	0.375	0.388	0.940
Gb ₃ [(d18:1)(C16:1)]	0.753	0.008*	0.689	0.076
Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)]	0.412	0.659	0.026*	1.000
Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)]Me	nd	nd	nd	nd
Gb ₃ [(d18:1)(C18:1)]	0.661	0.179	0.529	0.414
Gb ₃ [(d18:1)(C20:0)]	0.753	1.000	0.607	0.199
Gb ₃ [(d18:1)(C20:1)]	nd	nd	nd	nd
Gb ₃ [(d18:1)(C20:0)]Me	0.661	0.536	0.776	0.825
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]	0.571	1.000	0.689	0.076
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]Me	0.661	0.724	0.181	0.199
Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)]	1.000	0.536	0.328	0.076
Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)]Me	0.226	0.596	0.088*	0.940
Gb ₃ [(d18:1)(C22:2)]	nd	nd	nd	nd
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]	0.753	0.860	0.328	0.330
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]Me	0.753	0.659	0.776	1.000
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]	0.571	0.791	0.388	0.604
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]Me	0.412	0.724	0.388	0.940
Gb ₃ [(d18:1)(C24:2)]	0.571	1.000	0.224	0.330
Gb ₃ [(d18:1)(C26:0)]	nd	nd	nd	nd
Gb ₃ [(d18:1)(C26:1)]	nd	nd	nd	nd
Ceramide (d18:1)(C16:0)]	0.001*†	0.104	0.026*	0.414
Total Gb₃	0.851	0.596	0.224	0.199

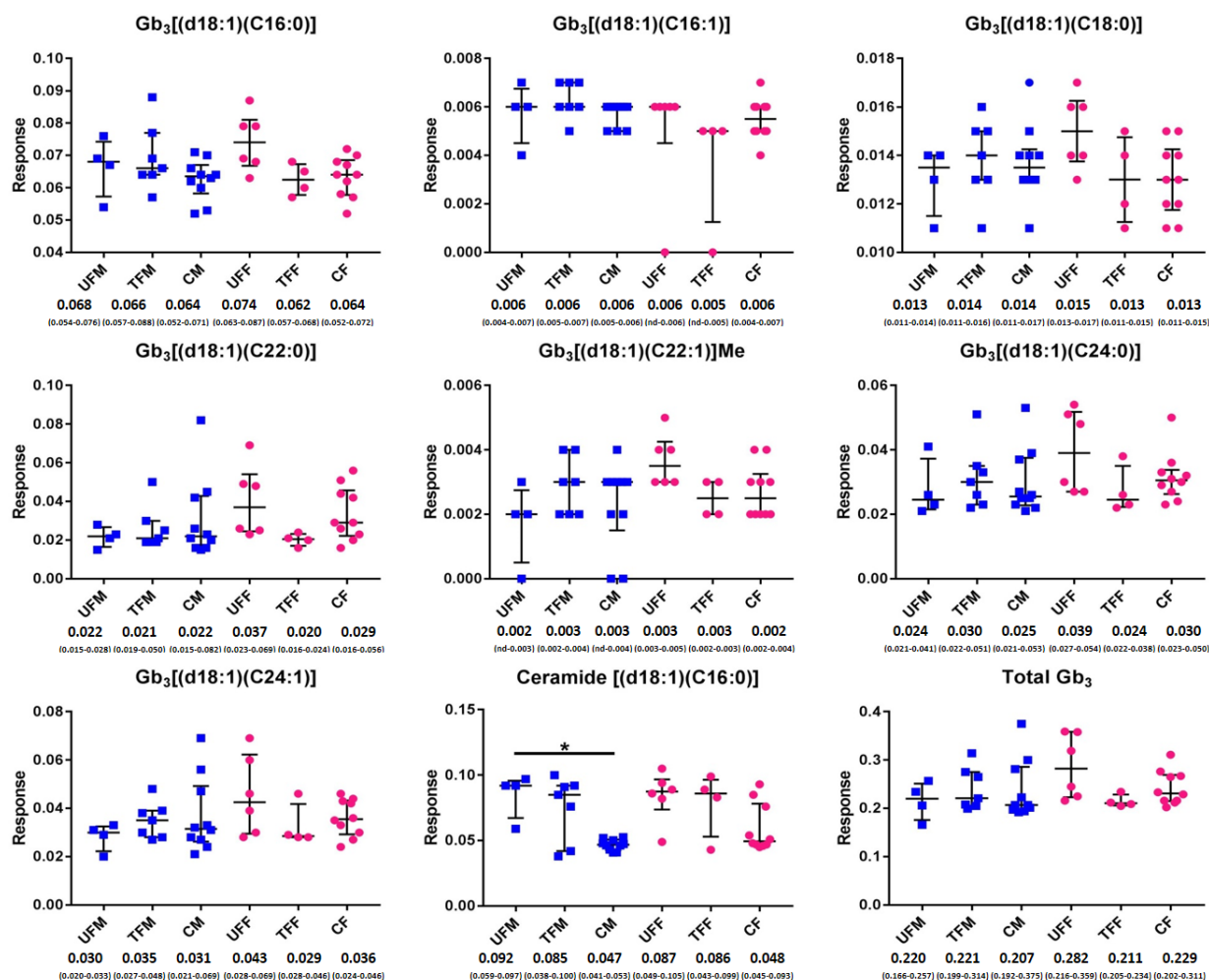


Fig. 4. Gb₃ isoform/analogs abundances expressed by the response (area/internal standard area) in B lymphocytes of untreated Fabry males (UFM) (n = 4), ERT-treated Fabry males (TFM) (n = 7), healthy control males (CM) (n = 10), untreated Fabry females (UFF) (n = 6), ERT-treated Fabry females (TFF) (n = 4) and healthy control females (CF) (n = 10). The graphics are presented as the median with interquartile range. Males are represented by the blue square symbol “■” and females by the pink round symbol “●”. Asterisks (*) represent significant differences between the groups. At the bottom of the graphics, the median is presented, along with the minimum and maximum values for the specific group.

3.5. Biomarker levels in monocytes

Fabry patients were separated into the same four groups as previously mentioned (Data for each patient available in Supplementary file 12). The distributions of the four Gb₃ groups in monocytes were almost the same in all Fabry patient subgroups and healthy controls. The average percentage of saturated Gb₃, unsaturated Gb₃ with one double bond, unsaturated Gb₃ with two double bonds and methylated Gb₃ were 59.4%, 18.6%, 3.4% and 18.8%, respectively. The most abundant isoforms/analogs were Gb₃[(d18:1)(C16:0)], Gb₃[(d18:1)(C16:0)]Me, Gb₃[(d18:1)(C22:0)], Gb₃[(d18:1)(C24:0)] and Gb₃[(d18:1)(C24:1)] (See Table 10). There were no significant differences after the *p*-value corrections in the Gb₃ isoform/analog distribution between Fabry patient subgroups and healthy controls. These data are presented in part in Figure 5 (All data are available in Supplementary file 13). Similar to B lymphocytes, the Gb₃ isoform/analog distribution shows an increase of the Gb₃ methylated group, especially for the Gb₃[(d18:1)(C16:0)]Me which represents 13.7% of total Gb₃ in monocytes.

Table 10

Distribution of four Gb₃ groups (saturated, unsaturated with one double bond, unsaturated with two double bonds and methylated) in the monocytes from Fabry patient subgroups and healthy controls.

	Untreated Fabry males (n = 4)	ERT-Treated Fabry males (n = 7)	Control males (n = 10)	Untreated Fabry females (n = 6)	ERT-Treated Fabry females (n = 4)	Control females (n = 10)
Saturated	61.3%	60.6%	58.2%	59.2%	56.2%	60.6%
Unsaturated with one double bound	17.5%	19.1%	19.1%	19.1%	16.7%	19.9%
Unsaturated with two double bounds	3.4%	3.2%	3.4%	3.0%	4.2%	3.1%
Methylated	17.5%	17.4%	19.4%	18.6%	23.2%	16.5%

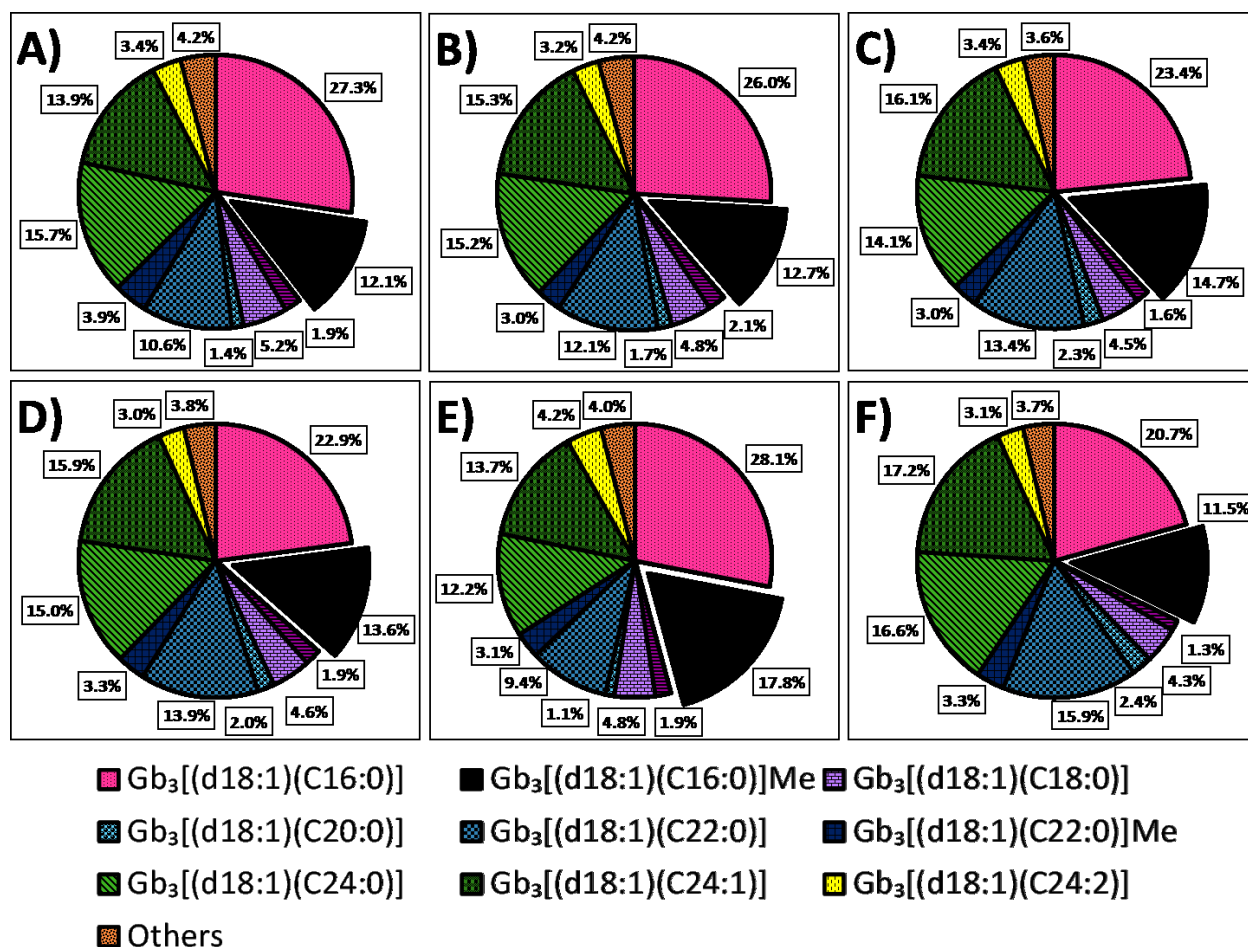


Fig. 5. Distribution of Gb₃ isoforms/analogues in monocytes from: (A) untreated Fabry males (UFM) (n = 4); (B) ERT-treated Fabry males (TFM) (n = 7); (C) healthy control males (CM) (n = 10); (D) untreated Fabry females (UFF) (n = 6); (E) ERT-treated Fabry females (TFF) (n = 4); (F) healthy control females (CF) (n = 10). The section “Others” includes the following less abundant isoforms/analogues: Gb₃[(d18:1)(C14:0)], Gb₃[(d18:1)(C16:1)], Gb₃[(d18:1)(C18:0)]Me, Gb₃[(d18:1)(C18:1)], Gb₃[(d18:1)(C20:0)]Me, Gb₃[(d18:1)(C20:1)], Gb₃[(d18:1)(C22:1)], Gb₃[(d18:1)(C22:2)], Gb₃[(d18:1)(C24:0)]Me, Gb₃[(d18:1)(C24:1)]Me, Gb₃[(d18:1)(C26:0)], Gb₃[(d18:1)(C26:1)].

For Gb₃ abundances in male cohorts, there was a tendency for Gb₃[(d18:1)(C16:0)], Gb₃[(d18:1)(C22:0)]Me, Gb₃[(d18:1)(C24:0)] and for total Gb₃ to be higher in untreated and treated Fabry patients than in healthy controls. For female cohorts, there was another slight tendency for Gb₃[(d18:1)(C22:0)], Gb₃[(d18:1)(C24:0)], Gb₃[(d18:1)(C24:1)] and for total

Gb₃ to be higher in healthy controls compared to Fabry patients. Nevertheless, there were no statistically significant differences between these latter patients and controls. Overall, there were no significant differences after the *p*-value corrections in all the isoforms/analogs of Gb₃ for the four subgroups of Fabry patients and for healthy controls. Results from the Mann-Whitney U test are presented in Table 11, an abbreviated form of the graphics of Gb₃ isoforms/analogs abundance are shown in Figure 6 (All the graphics are available in Supplementary file 14).

Gb₃ isoforms/analogs which were possible to quantify in the majority of Fabry patients and healthy controls were Gb₃[(d18:1)(C16:0)], Gb₃[(d18:1)(C16:0)]Me, Gb₃[(d18:1)(C20:0)], Gb₃[(d18:1)(C22:0)], Gb₃[(d18:1)(C22:0)]Me, Gb₃[(d18:1)(C24:0)], Gb₃[(d18:1)(C24:1)] and Gb₃[(d18:1)(C24:1)]. Other isoforms/analogs of Gb₃ showed lower levels than the LOQ, but beyond the LOD. These latter biomarkers were still mentioned in the Tables and Graphics to provide a quantity profile.

As mentioned for B lymphocytes, ceramides [(d18:1)(C16:0)] were analyzed. Our results show an elevation in ceramide levels in the monocytes of the four subgroups of Fabry patients. Nevertheless, and unlike the lymphocytes, there were no significant differences for ceramide levels in monocytes.

Table 11

Differences expressed by *p*-values in monocyte Gb₃ accumulation between Fabry patient subgroups and gender-matched healthy controls. *: indicates a statistically significant result. The Benjamini and Hochberg corrections for multiple comparisons (24 comparisons) were performed, but none were found to be significant.

	Untreated Fabry males (n = 4)	ERT-Treated Fabry males (n = 7)	Untreated Fabry females (n = 6)	ERT-Treated Fabry females (n = 4)
Gb ₃ [(d18:1)(C14:0)]	0.280	0.791	0.529	0.260
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]	0.226	0.285	0.328	0.260
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]Me	0.056	0.246	0.955	0.825
Gb ₃ [(d18:1)(C16:1)]	0.280	0.044*	0.776	0.414
Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)]	0.177	0.479	0.456	0.076
Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)]Me	nd	nd	nd	nd
Gb ₃ [(d18:1)(C18:1)]	0.343	0.246	0.607	0.414
Gb ₃ [(d18:1)(C20:0)]	0.949	0.791	0.388	0.050
Gb ₃ [(d18:1)(C20:1)]	nd	nd	nd	nd
Gb ₃ [(d18:1)(C20:0)]Me	0.343	0.930	0.181	0.414
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]	0.949	0.930	0.607	0.106
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]Me	0.571	0.659	0.328	0.034*
Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)]	nd	nd	nd	nd
Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)]Me	0.571	0.285	0.224	0.330
Gb ₃ [(d18:1)(C22:2)]	nd	nd	nd	nd
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]	0.851	0.724	0.272	0.034*
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]Me	0.280	0.860	0.955	0.604
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]	0.949	0.860	0.328	0.050
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]Me	0.078	0.860	0.026*	0.050
Gb ₃ [(d18:1)(C24:2)]	0.851	0.860	0.388	0.710
Gb ₃ [(d18:1)(C26:0)]	1.000	0.425	0.776	0.330
Gb ₃ [(d18:1)(C26:1)]	0.412	0.375	0.272	0.076
Ceramide [(d18:1)(C16:0)]	0.177	0.328	0.272	0.604
Total Gb ₃	0.949	0.596	0.328	0.034*

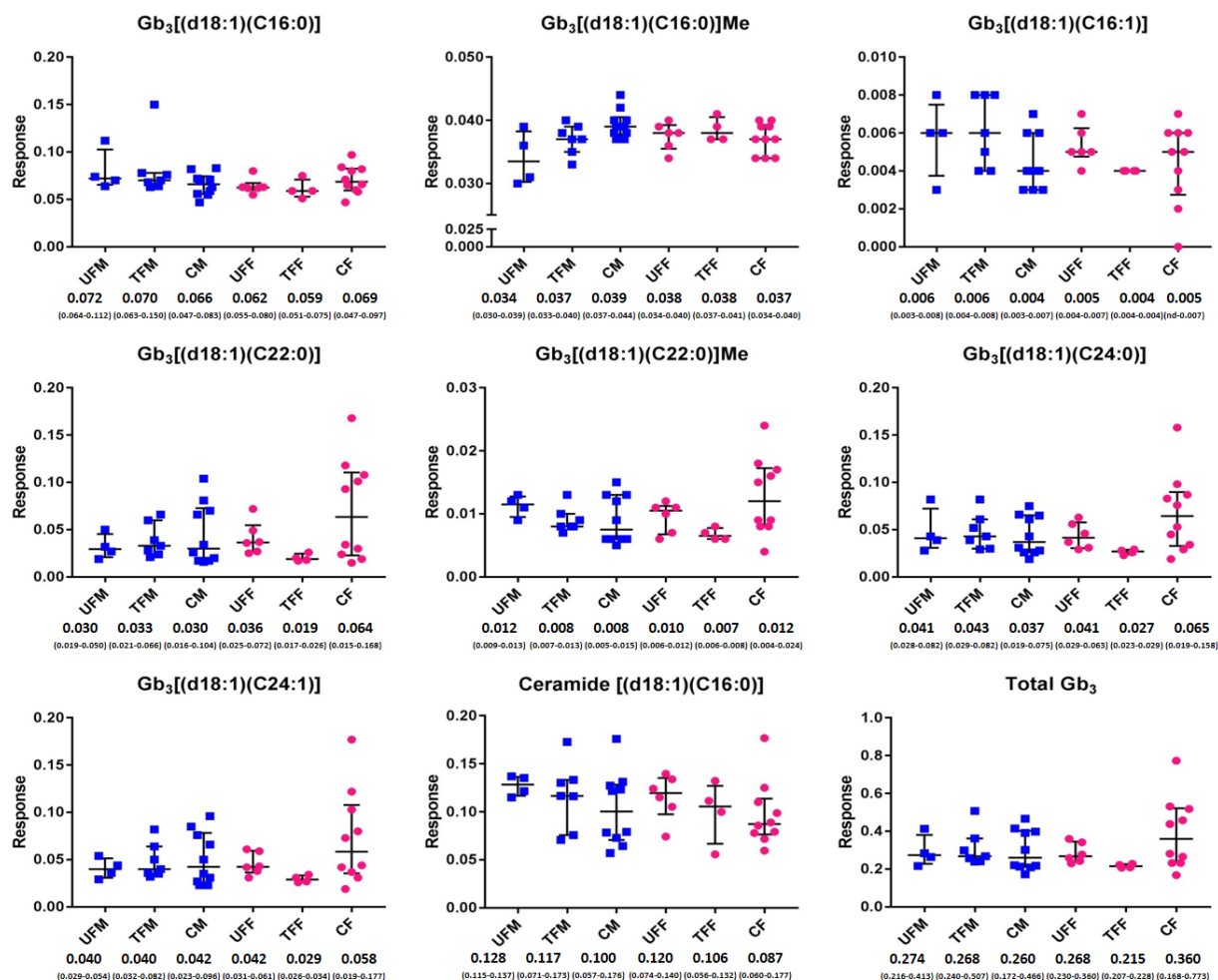


Fig. 6. Gb₃ isoform/analog abundances expressed by the response (area/internal standard area) in monocytes for untreated Fabry males (UFM) (n = 4), ERT-treated Fabry males (TFM) (n = 7), healthy control males (CM) (n = 10), untreated Fabry females (UFF) (n = 6), ERT-treated Fabry females (TFF) (n = 6) and healthy control females (CF) (n = 10). The graphics are shown as the median with interquartile range. Males are represented by the blue square symbol “■” and females by the pink round symbol “●”. Asterisks (*) represent significant differences between the groups. At the bottom of the graphics, the median is presented, along with the minimum and maximum values for the specific group.

3.6. Biomarker levels in plasma

In order to establish normal values for plasma Gb₃, fifty plasma specimens from controls, purchased from Bioreclamation, were added to the twenty healthy controls enrolled in the study, to ensure a powerful statistical analysis. Comparisons were performed between Fabry patient subgroups and twenty healthy controls.

Normal values of plasma Gb₃ were established by adding 2 standard deviations to the mean values obtained. Results for Gb₃[(d18:1)(C16:0)], Gb₃[(d18:1)(C16:1)], Gb₃[(d18:1)(C18:0)], Gb₃[(d18:1)(C22:0)], Gb₃[(d18:1)(C24:0)], Gb₃[(d18:1)(C24:1)] and total Gb₃ were 2.24, 0.26, 0.26, 0.34, 0.50, 0.68 and 4.04 μ M, respectively.

Analysis of plasma Gb₃ shows for the male cohorts a tendency for untreated patients to have a higher level of Gb₃ than healthy controls without reaching statistical significance. Between ERT-treated Fabry patients and healthy controls, some of the biomarkers, including total Gb₃ isoforms/analogs were significantly higher in Fabry patients. For the female cohorts, only Gb₃[(d18:1)(C24:0)] and Gb₃[(d18:1)(C24:1)] were significantly higher in ERT-treated Fabry patients. The most abundant Gb₃ biomarker for all the four groups was Gb₃[(d18:1)(C16:0)] (See Table 12 and the data for each patient available in Supplementary file 15).

Analysis of plasma lyso-Gb₃ demonstrated an improved discrimination between the four groups of Fabry patients. For the analogs of lyso-Gb₃ at *m/z* (-28), (-2), (+16), and (+18), our results in Table 12 show that untreated and ERT-treated Fabry patients were significantly different from healthy controls for male and female cohorts (Data for each patient available in Supplementary file 16).

Healthy control sample analyses show that results are all within normal limits for plasma Gb₃ isoforms/analogs and for lyso-Gb₃ analogs [9].

Table 12

Concentrations of Gb₃ isoforms/analogs in plasma expressed in μM , the lyso-Gb₃ and related analogs expressed in nM for untreated and ERT-treated Fabry patients compared with healthy controls. (Mann-Whitney U Test). *: indicates a statistically significant result; †: indicates that statistical significance was still valid after the Benjamini and Hochberg corrections for multiple comparisons (7 and 8 comparisons, respectively).

	Untreated Fabry males (n = 4)	ERT-Treated Fabry males (n = 7)	Untreated Fabry females (n = 6)	ERT-Treated Fabry females (n = 4)
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]	4.48	1.65	1.67	2.47
Gb ₃ [(d18:1)(C16:1)]	0.67	0.20	0.23	0.31
Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)]	0.55	0.28*†	0.21	0.27
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]	0.55	0.26*†	0.25	0.19
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]	0.97	0.48*†	0.34*†	0.25
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]	1.12	0.71*†	0.69*†	0.50
Total Gb₃	8.39	3.66*†	3.38	4.04
Lyso-Gb ₃	131.86*†	36.42*†	9.82*†	11.02*†
Lyso-Gb ₃ (-28)	6.04*†	1.51*†	0.33*†	0.33*†
Lyso-Gb ₃ (-2)	25.96*†	10.12*†	2.88*†	3.15*†
Lyso-Gb ₃ (+16)	10.82*†	6.94*†	0.66*†	0.98*†
Lyso-Gb ₃ (+18)	19.26*†	4.07*†	1.04*†	0.78*†
Lyso-Gb ₃ (+34)	19.03*†	2.98*†	0.17*†	0.15
Lyso-Gb ₃ (+50)	3.13*†	0.47	0.00	0.15
Total lyso-Gb₃	216.09*†	62.52*†	14.89*†	16.55*†

3.7. Biomarker levels in urine

Analysis of Gb₃ in urine shows a significant discrimination, even after the *p*-value corrections, between untreated Fabry patients and healthy controls, for male and female cohorts. Some of the biomarkers were statistically significant between ERT-treated Fabry patients and healthy controls. The most abundant Gb₃ was Gb₃[(d18:1)(C22:0)] followed by Gb₃[(d18:1)(C16:0)]. Data are shown in Table 13 and data of each patient are available in Supplementary file 17.

Analyses of lyso-Gb₃ in urine show a significant discrimination for most of the analogs of lyso-Gb₃ and Gb₃ itself as indicated in Table 13 (Data for each patient available in Supplementary file 18).

Healthy control samples analyzed show results within the normal limits for Gb₃ isoforms/analogs and for lyso-Gb₃ and analogs in urine [9].

Table 13

Concentrations of Gb₃ isoforms/analogs in urine expressed in $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ of creatinine and lyso-Gb₃ and related analogs expressed in pmol/mmol of creatinine for untreated, ERT-treated Fabry patients and healthy controls (Mann-Whitney U Test). *: indicates a statistically significant result; †: indicates that statistical significance was still valid after the Benjamini and Hochberg corrections for multiple comparisons (15 and 10 comparisons respectively).

	Untreated Fabry males (n = 4)	ERT-Treated Fabry males (n = 7)	Untreated Fabry females (n = 6)	ERT-Treated Fabry females (n = 4)
Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)]Me	1.67*†	0.00	0.22*†	0.00
Gb ₃ [(d18:1)(C20:0)]Me	2.26*†	0.04*	0.31*†	0.00
Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)]Me	2.81*†	0.09*	0.53*†	0.05
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]Me	7.30*†	0.16*†	1.03*†	0.09
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]Me	2.11*†	0.00	0.22*†	0.00
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]Me	0.83*†	0.00	0.19*†	0.00
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]	36.45*†	2.70*†	6.10*†	0.85*
Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)]	10.52*†	0.17*†	1.05*†	0.10
Gb ₃ [(d18:1)(C20:0)]	18.60*†	0.58*	1.79*†	0.17
Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)]	9.85*†	0.27*†	1.21*†	0.12
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]	59.74*†	1.07	5.43*†	0.58
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]	0.31	0.76	9.97*†	0.91*
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]	0.29	0.70	8.74*†	0.83
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)OH]	1.46*†	0.00	0.18	0.00
Total Gb₃	153.59*†	10.92*†	41.48*†	3.70*
Lyso-Gb ₃	155.23	41.49*†	29.66*†	8.71
Lyso-Gb ₃ (-28)	77.28*†	15.62*†	11.30*†	0.53*
Lyso-Gb ₃ (-12)	446.06*†	143.02*†	56.71*†	39.30*
Lyso-Gb ₃ (-2)	82.44*†	25.46*†	13.57*†	3.08*
Lyso-Gb ₃ (+14)	141.65*†	36.62*†	15.10*†	6.70*
Lyso-Gb ₃ (+16)	579.23*†	284.55*†	100.46*†	48.79*
Lyso-Gb ₃ (+34)	424.80*†	182.15*†	59.37*†	32.19*
Lyso-Gb ₃ (+50)	684.67*†	108.16*†	36.14*†	22.35
Total lyso-Gb₃	2591.35*†	859.00*†	358.63*†	171.18

3.8 Statistical analyses

3.8.1 ROC curve analysis

ROC curve analysis was performed in order to identify biomarkers which provided a good discrimination between patients and healthy controls. For leukocytes, Gb₃[(d18:1)(C14:0)], Gb₃[(d18:1)(C16:0)], Gb₃[(d18:1)(C16:0)]Me, Gb₃[(d18:1)(C16:1)], Gb₃[(d18:1)(C18:0)], Gb₃[(d18:1)(C18:1)], Gb₃[(d18:1)(C20:1)], Gb₃[(d18:1)(C24:2)], Gb₃[(d18:1)(C26:1)] and total Gb₃ isoforms/analogues were statistically significant after the *p*-value corrections between ERT-treated Fabry males and healthy control males. The significant ROC curves (an area of 1.0 represent a perfect test and an area of 0.5 represent a worthless test) are shown in Figure 7 (Data are shown in Tables 14 and 15 for males and females). For B lymphocytes and monocytes there were no significant differences after the *p*-value corrections (Data are available in Supplementary files 19-20).

Table 14

ROC Curve analysis of Gb₃ isoforms/analogs of Fabry biomarkers in leukocytes. AUCs: area under the curves, CI: confidence interval, UFM: untreated Fabry males (n = 4), TFM: ERT-treated Fabry males (n = 7). *: indicates a statistically significant result; †: indicates that statistical significance was still valid after the Benjamini and Hochberg corrections for multiple comparisons (24 comparisons).

	AUCs		Asymptotic 95% CI		Asymptotic sig.	
	UFM	TFM	UFM	TFM	UFM	TFM
Gb ₃ [(d18:1)(C14:0)]	0.917	0.873	0.742-1.000	0.680-1.000	0.021*	0.013*†
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]	0.806	0.952	0.464-1.000	0.847-1.000	0.090	0.003*†
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]Me	0.833	0.968	0.572-1.000	0.890-1.000	0.064	0.002*†
Gb ₃ [(d18:1)(C16:1)]	0.917	0.952	0.742-1.000	0.847-1.000	0.021*	0.003*†
Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)]	0.806	0.984	0.464-1.000	0.935-1.000	0.090	0.001*†
Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)]Me	0.472	0.762	0.096-0.848	0.508-1.000	0.877	0.081
Gb ₃ [(d18:1)(C18:1)]	0.806	0.921	0.506-1.000	0.781-1.000	0.090	0.005*†
Gb ₃ [(d18:1)(C20:0)]	0.333	0.746	0.036-0.631	0.499-0.993	0.355	0.101
Gb ₃ [(d18:1)(C20:0)]Me	0.417	0.794	0.076-0.758	0.564-1.000	0.643	0.050*
Gb ₃ [(d18:1)(C20:1)]	0.750	0.984	0.373-1.000	0.935-1.000	0.165	0.001*†
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]	0.333	0.698	0.039-0.628	0.429-0.967	0.355	0.186
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]Me	0.500	0.794	0.110-0.890	0.571-1.000	1.000	0.050*
Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)]	0.250	0.794	0.000-0.521	0.571-1.000	0.165	0.050*
Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)]Me	0.417	0.762	0.067-0.766	0.510-1.000	0.643	0.081
Gb ₃ [(d18:1)(C22:2)]	0.417	0.873	0.071-0.763	0.699-1.000	0.643	0.013*†
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]	0.528	0.841	0.166-0.890	0.643-1.000	0.877	0.023*†
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]Me	0.639	0.857	0.297-0.981	0.668-1.000	0.440	0.017*†
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]	0.556	0.937	0.220-0.891	0.807-1.000	0.758	0.004*†
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]Me	0.583	0.921	0.252-0.915	0.788-1.000	0.643	0.005*†
Gb ₃ [(d18:1)(C24:2)]	0.556	0.984	0.172-0.939	0.935-1.000	0.758	0.001*†
Gb ₃ [(d18:1)(C26:0)]	0.639	0.873	0.314-0.964	0.699-1.000	0.440	0.013*†
Gb ₃ [(d18:1)(C26:1)]	0.583	0.952	0.218-0.949	0.848-1.000	0.643	0.003*†
Ceramide [(d18:1)(C16:0)]	0.278	0.460	0.000-0.588	0.154-0.766	0.217	0.791
Total Gb₃	0.778	1.000	0.395-1.000	1.000-1.000	0.123	0.001*†

Table 15

ROC Curve analysis of Gb₃ isoforms/analogs in leukocytes. AUCs: area under the curves, CI: confidence interval, UFF: untreated Fabry females (n = 6), TFF: ERT-treated Fabry females (n = 4). *: indicates a statistically significant result; †: indicates that statistical significance was still valid after the Benjamini and Hochberg corrections for multiple comparisons (24 comparisons).

	AUCs		Asymptotic 95% CI		Asymptotic sig.	
	UFF	TFF	UFF	TFF	UFF	TFF
Gb ₃ [(d18:1)(C14:0)]	0.593	0.667	0.255-0.930	0.328-1.000	0.566	0.355
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]	0.722	0.722	0.452-0.993	0.433-1.000	0.157	0.217
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]Me	0.741	0.611	0.482-0.999	0.301-0.921	0.126	0.537
Gb ₃ [(d18:1)(C16:1)]	0.667	0.778	0.344-0.989	0.474-1.000	0.289	0.123
Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)]	0.593	0.528	0.295-0.890	0.215-0.841	0.556	0.877
Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)]Me	0.574	0.528	0.272-0.876	0.215-0.841	0.637	0.877
Gb ₃ [(d18:1)(C18:1)]	0.722	0.861	0.447-0.997	0.636-1.000	0.157	0.045*
Gb ₃ [(d18:1)(C20:0)]	0.537	0.417	0.229-0.846	0.106-0.727	0.814	0.643
Gb ₃ [(d18:1)(C20:0)]Me	0.611	0.500	0.319-0.904	0.177-0.823	0.480	1.000
Gb ₃ [(d18:1)(C20:1)]	0.611	0.528	0.319-0.903	0.213-0.842	0.480	0.877
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]	0.500	0.389	0.185-0.815	0.079-0.699	1.000	0.537
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]Me	0.648	0.389	0.354-0.940	0.079-0.699	0.346	0.537
Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)]	0.500	0.417	0.196-0.804	0.106-0.727	1.000	0.643
Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)]Me	0.574	0.500	0.274-0.874	0.178-0.822	0.637	1.000
Gb ₃ [(d18:1)(C22:2)]	0.593	0.528	0.300-0.886	0.212-0.844	0.556	0.877
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]	0.556	0.389	0.251-0.860	0.079-0.699	0.724	0.537
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]Me	0.648	0.500	0.361-0.936	0.177-0.823	0.346	1.000
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]	0.611	0.417	0.316-0.907	0.106-0.727	0.480	0.643
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]Me	0.648	0.500	0.364-0.932	0.177-0.823	0.346	1.000
Gb ₃ [(d18:1)(C24:2)]	0.630	0.528	0.342-0.917	0.212-0.844	0.409	0.877
Gb ₃ [(d18:1)(C26:0)]	0.593	0.417	0.296-0.889	0.094-0.739	0.556	0.643
Gb ₃ [(d18:1)(C26:1)]	0.556	0.389	0.250-0.861	0.079-0.699	0.724	0.537
Ceramide [(d18:1)(C16:0)]	0.315	0.250	0.008-0.621	0.000-0.554	0.239	0.165
Total Gb₃	0.574	0.500	0.278-0.870	0.188-0.812	0.637	1.000

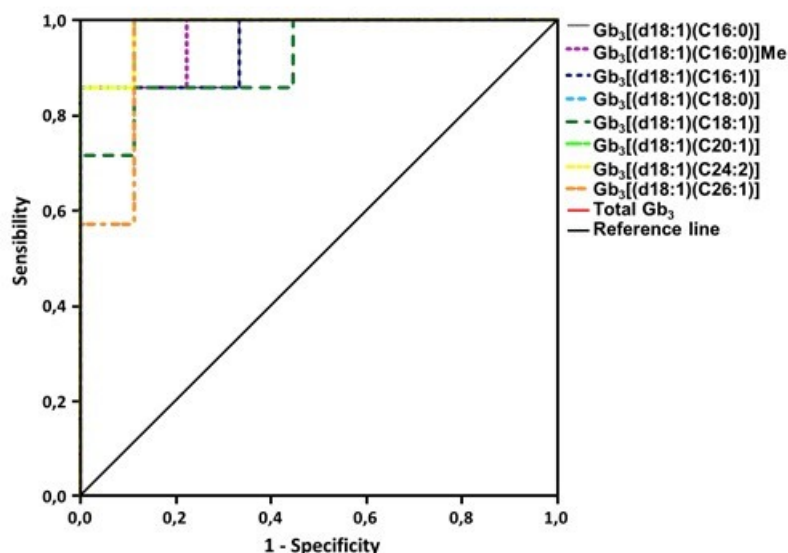


Fig. 7. ROC curves of significant Gb₃ isoforms/analogs in leukocytes from ERT-treated Fabry males.

3.8.2 Biomarker intercorrelation

A Spearman's rank-order correlation was performed to assess the relationship between biomarkers in leukocytes, B lymphocytes and monocytes with the total Gb₃ levels in plasma and urine, as well as the total lyso-Gb₃ levels in plasma and urine. Significant results were obtained, but the statistical significance was lost after the Benjamini and Hochberg *p*-value corrections (Data available in Supplementary file 21-23). For plasma, unfractionated leukocytes, B lymphocytes and monocytes, Gb₃[(d18:1)(C16:0)] was found to be the most elevated biomarker. Other biomarkers that were strongly accumulated in these matrices were Gb₃ [(d18:1)(C22:0)], Gb₃ [(d18:1)(C24:0)] and Gb₃ [(d18:1)(C24:1)]. In urine, depending of the groups evaluated, Gb₃ [(d18:1)(C16:0)], Gb₃ [(d18:1)(C22:0)] and Gb₃ [(d18:1)(C24:0)] showed the highest accumulation levels. These results are consistent with other studies using different matrices [37,39].

3.9 Correlation between biomarker levels in blood cells and mutation types

Among this cohort of Fabry patients, an untreated male patient was studied with the *p*.N215S cardiac variant mutation. Recent studies have shown that this mutation leads to reduced accumulation of Gb₃ [24,45] in urine. As expected, Gb₃ levels in unfractionated leukocytes,

monocytes, plasma and urine for this late-onset cardiac variant mutation patient were similar compared to the levels of Gb₃ isoforms/analogs observed in healthy controls. Upon a statistical point of view, this patient has reduced the median levels for untreated Fabry males and this has led to less significant results compared to healthy controls.

There were also nonsense and missense mutations, as well as deletions among untreated Fabry male patients, but we found that there were no clear tendencies regarding the effect of these mutation types on Gb₃ isoform/analog levels. In treated Fabry males there were two nonsense mutations (patients P6 and P7). In monocytes, patient P7 presented higher levels for some isoforms/analogs compared to other patients.

In untreated Fabry females, one patient with a frameshift mutation (patient P13) and two patients with nonsense mutations (patients P4 and P5) were associated with more severe complications (See Supplementary file 6, 9 or 12 for the patient's nomenclature). For Gb₃ isoforms/analogs in unfractionated leukocytes, we found that patient P4 had higher elevations than the other patients in this group. The frameshift mutation in patient P13 was also associated with higher levels of Gb₃ isoforms/analogs than the others, but less significantly than patient P4. Finally, patient P5 was in the same range as the other patients in this group. For total Gb₃ in B lymphocytes, our results show that patients P4 and P13 presented higher levels of total Gb₃ isoforms/analogs than the other patients, followed by patient P5. The fact that both of the nonsense mutations in P4 and P5 patients were not similarly elevated might be due to the random X inactivation, which was less favorable for P4 than P5 [46]. The X-inactivation possibility might also apply to another treated Fabry female who did not show higher levels of Gb₃ in all the matrices studied compared to the other females.

4. Conclusions

A UPLC-MS/MS method was developed and validated for the relative quantitation of four Gb₃ isoform/analog groups: saturated, unsaturated with one double bond, unsaturated with two double bonds and methylated in leukocytes, B lymphocytes and monocytes of Fabry patients and healthy controls. Samples from 21 Fabry patients and 20 healthy controls were analyzed. The EasySep kits from Stemcell provide an efficient tool to collect specific blood

cells, to purify them and they were compatible with mass spectrometry analysis. Liquid-liquid extraction of Gb₃ allowed a good recovery rate and reproducible results. Liquid chromatography was established in order to reduce matrix effects caused by other metabolites in blood cells. Tandem mass spectrometry allowed a highly sensitive multiplex analysis considering the low quantities of Gb₃ isoform/analog biomarkers in B lymphocytes and monocytes.

Limitations of this study were the small number of patients available, considering the large amount of blood which had to be collected from each patient and the rapid processing of the samples required after the blood collection. In addition, the cohort of Fabry patients was quite heterogeneous with many different mutations, such as the patient with the cardiac variant *p.N215S* mutation. This led to a reduced number of significant differences.

Gb₃ isoforms/analogues which were possible to quantify in the majority of Fabry patients and healthy controls were: Gb₃[(d18:1)(C16:0)], Gb₃[(d18:1)(C20:0)], Gb₃[(d18:1)(C22:0)], Gb₃[(d18:1)(C22:0)]Me, Gb₃[(d18:1)(C24:0)], Gb₃[(d18:1)(C24:0)]Me and Gb₃[(d18:1)(C24:1)]. Other isoforms/analogues of Gb₃ were lower than the LOQ, but beyond the LOD, the quantities were still mentioned in order to provide an abundance profile.

To our knowledge, this is the first time that methylated Gb₃ groups were detected in blood cells which reinforces the possible pathway between Gb₃ and lyso-Gb₃ as shown previously by our group [6,12]. Therefore, the methylation of Gb₃ isoforms/analogues might play a role in the pathophysiology of the disease so that higher levels of methylated Gb₃ biomarkers might possibly affect Fabry patients differently.

We noticed a consistency in the results of the most accumulated isoforms/analogues of Gb₃; between the plasma, urine, unfractionated leukocytes, B lymphocytes and monocytes, Gb₃[(d18:1)(C16:0)] was the most elevated in all the groups, except in urine. Gb₃[(d18:1)(C22:0)], Gb₃[(d18:1)(C24:0)] and Gb₃[(d18:1)(C24:1)] were the most prominent of the Gb₃ isoforms/analogues detected.

In addition, B lymphocytes and monocytes, taken separately have a larger proportion of methylated Gb₃ isoforms/analogs than total leukocytes. Neutrophils represent a large proportion of total leukocytes; they may have a proportionately less important contribution to Gb₃ isoforms/analogs of methylated Gb₃. Between the groups of untreated and ERT-treated Fabry patients and healthy controls, no significant changes in the distribution of Gb₃ groups in blood cells were found.

In some cases, the severity of Fabry patient mutations (late-onset cardiac variant, frameshift, nonsense, missense mutations) seemed to be related to the levels of biomarkers found in blood cells. This study helped us to have a better comprehension of the Gb₃ pathway in blood cells which might be helpful for the monitoring of patients.

Moreover, it is noteworthy to mention that all leukocytes are derived from a multipotential hematopoietic stem cell also known as hemocytoblast. The profile of biomarkers detected in each cell type under study might not only demonstrate the distribution among cell types, but may also suggest a similar distribution in hemocytoblasts [47].

Disclaimer

No funding organization played a role in the design of the study, interpretation of data, and preparation of this manuscript.

Acknowledgements

This research was supported by funds received by Christiane Auray-Blais. We are grateful to Waters Corporation for their continued scientific support and partnership. We would like to thank Dr. Joe T. R. Clarke for his scientific expertise. We would like to thank Chantal Boivin and Caroline Barr for their help during the enrollment of Fabry patients and healthy controls in Sherbrooke. We would like to acknowledge the dedicated collaboration of colleagues and coordinating-nurses at the Canadian Fabry Disease Initiative. We thank all Fabry patients and healthy reference controls who generously provided blood and urine samples for this study. We would like to thank the “Centre d'excellence en recherche Mère-Enfant de l'Université de Sherbrooke” for scholarships for Amanda Toupin.

References

- [1] R. El-Abassi, D. Singhal, J.D. England, Fabry's disease, *J. Neurol. Sci.* 344 (2014) 5–19. doi:10.1016/j.jns.2014.06.029.
- [2] J.T.R. Clarke, Narrative review: Fabry disease, *Ann. Intern. Med.* 146 (2007) 425–433.
- [3] D.P. Germain, Fabry disease, (2010) 1–50. doi:10.1186/1750-1172-5-30.
- [4] [Www.hgmd.org](http://www.hgmd.org), Human Gene Mutation Database (HGMD).
- [5] G. Parenti, G. Andria, A. Ballabio, Lysosomal Storage Diseases: From Pathophysiology to Therapy, *Annu. Rev. Med.* 66 (2015) 471–486. doi:10.1146/annurev-med-122313-085916.
- [6] M. Abaoui, M. Boutin, P. Lavoie, C. Auray-Blais, Tandem mass spectrometry multiplex analysis of methylated and non-methylated urinary Gb₃ isoforms in Fabry disease patients, *Clin. Chim. Acta.* 452 (2016) 191–198. doi:10.1016/j.cca.2015.11.018.
- [7] M. Boutin, R. Gagnon, P. Lavoie, C. Auray-Blais, LC–MS/MS analysis of plasma lyso-Gb₃ in Fabry disease, *Clin. Chim. Acta.* 414 (2012) 273–280. doi:10.1016/j.cca.2012.09.026.
- [8] P. Lavoie, M. Boutin, C. Auray-Blais, Multiplex analysis of novel urinary lyso-Gb₃-related biomarkers for Fabry disease by tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.* 85 (2013) 1743–1752. doi:10.1021/ac303033v.
- [9] M. Boutin, C. Auray-Blais, Multiplex tandem mass spectrometry analysis of novel plasma lyso-Gb₃-related analogues in Fabry disease, *Anal. Chem.* 86 (2014) 3476–83. doi:10.1021/ac404000d.
- [10] M. Boutin, P. Lavoie, M. Abaoui, C. Auray-Blais, Tandem Mass Spectrometry Quantitation of Lyso-Gb₃ and Six Related Analogs in Plasma for Fabry Disease Patients, *Curr. Protoc. Hum. Genet.* 90 (2016) 17.23.1-9. doi:10.1002/cphg.4.
- [11] C. Auray-Blais, M. Boutin, R. Gagnon, F.O. Dupont, P. Lavoie, J.T.R. Clarke, Urinary globotriaosylsphingosine-related biomarkers for Fabry disease targeted by metabolomics, *Anal. Chem.* 84 (2012) 2745–2753. doi:10.1021/ac203433e.

- [12] M. Boutin, C. Auray-Blais, Metabolomic Discovery of Novel Urinary Galabiosylceramide Analogs as Fabry Disease Biomarkers, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 26 (2015) 499–510. doi:10.1007/s13361-014-1060-3.
- [13] R. Schiffmann, M. Ries, Fabry Disease: A Disorder of Childhood Onset, *Pediatr. Neurol.* 64 (2016) 10–20. doi:10.1016/j.pediatrneurol.2016.07.001.
- [14] M.G. Bouwman, H. Maurice-Stam, G.E. Linthorst, C.E.M. Hollak, F.A. Wijburg, M.A. Grootenhuys, Impact of growing up with Fabry disease on achievement of psychosocial milestones and quality of life, *Mol. Genet. Metab.* 104 (2011) 308–313. doi:10.1016/j.ymgme.2011.07.006.
- [15] A. Mehta, M. Beck, G. Sunder-Plassmann, Cox, TM Fabry Disease: Perspectives from 5 years of FOS, Oxford PharmaGenesis, Oxford, UK. (2006).
- [16] J.P. Nuñez, A. Ortiz, A.B. Sanz, M. Sanchez-Niño Maria Dolores, Fabry Disease : A Metabolic Proteinuric Nephropathy, (2010).
- [17] K.D. MacDermot, A. Holmes, A.H. Miners, Anderson-Fabry disease: clinical manifestations and impact of disease in a cohort of 98 hemizygous males, *J. Med. Genet.* 38 (2001) 750–760. doi:10.1136/jmg.38.11.750.
- [18] R.Y. Wang, A. Lelis, J. Mirocha, W.R. Wilcox, Heterozygous Fabry women are not just carriers, but have a significant burden of disease and impaired quality of life, *Genet. Med.* 9 (2007) 34–45. doi:10.1097/GIM.0b013e31802d8321.
- [19] C. Kampmann, F. Baehner, C. Whybra, C. Martin, C.M. Wiethoff, M. Ries, A. Gal, M. Beck, Cardiac manifestations of Anderson-Fabry disease in heterozygous females, *J. Am. Coll. Cardiol.* 40 (2002) 1668–1674. doi:10.1016/S0735-1097(02)02380-X.
- [20] A. Mehta, R. Ricci, U. Widmer, F. Dehout, A. Garcia De Lorenzo, C. Kampmann, A. Linhart, G. Sunder-Plassmann, M. Ries, M. Beck, Fabry disease defined: Baseline clinical manifestations of 366 patients in the Fabry Outcome Survey, *Eur. J. Clin. Invest.* 34 (2004) 236–242. doi:10.1111/j.1365-2362.2004.01309.x.
- [21] C. Auray-Blais, D.S. Millington, S.P. Young, J.T.R. Clarke, R. Schiffmann, Proposed high-risk screening protocol for Fabry disease in patients with renal and vascular disease, *J. Inherit. Metab. Dis.* 32 (2009) 303–308. doi:10.1007/s10545-009-1055-6.
- [22] L. Michaud, Vascular tortuosities of the upper eyelid: A new clinical finding in Fabry patient screening, *J. Ophthalmol.* 2013 (2013). doi:10.1155/2013/207573.

- [23] H.Y. Lin, K.W. Chong, J.H. Hsu, H.C. Yu, C.C. Shih, C.H. Huang, S.J. Lin, C.H. Chen, C.C. Chiang, H.J. Ho, P.C. Lee, C.H. Kao, K.H. Cheng, C. Hsueh, D.M. Niu, High incidence of the cardiac variant of Fabry disease revealed by newborn screening in the Taiwan Chinese population, *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2 (2009) 450–456. doi:10.1161/CIRCGENETICS.109.862920.
- [24] C. Auray-Blais, P. Lavoie, M. Boutin, A. Ntwari, T.-R. Hsu, C.-K. Huang, D.-M. Niu, Biomarkers associated with clinical manifestations in Fabry disease patients with a late-onset cardiac variant mutation, *Clin. Chim. Acta.* 466 (2017) 185–193. doi:10.1016/j.cca.2017.01.018.
- [25] J.Q. Fan, S. Ishii, Active-site-specific chaperone therapy for Fabry disease: Yin and Yang of enzyme inhibitors, *FEBS J.* 274 (2007) 4962–4971. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.06041.x.
- [26] F.M. Platt, T.D. Butters, Substrate deprivation: A new therapeutic approach for the glycosphingolipid lysosomal storage diseases, *Expert Rev. Mol. Med.* 2 (2004) 1–17. doi:10.1017/S1462399400001484.
- [27] S. Alipourfetrati, A. Saeed, J.M. Norris, A Review of Current and Future Treatment Strategies for Fabry Disease : A Model for Treating Lysosomal Storage Diseases, *J. Pharmacol. Clin. Toxicol.* 3 (2015).
- [28] K. Lee, X. Jin, K. Zhang, L. Copertino, L. Andrews, J. Baker-Malcolm, L. Geagan, H. Qiu, K. Seiger, D. Barngrover, J.M. McPherson, T. Edmunds, A biochemical and pharmacological comparison of enzyme replacement therapies for the glycolipid storage disorder Fabry disease, *Glycobiology.* 13 (2003) 305–313. doi:10.1093/glycob/cwg034.
- [29] D. Oder, P. Nordbeck, C. Wanner, Long Term Treatment with Enzyme Replacement Therapy in Patients with Fabry Disease, *Nephron.* 134 (2016) 30–36. doi:10.1159/000448968.
- [30] B.E. Smid, S.L. Hoogendijk, F.A. Wijburg, C.E.M. Hollak, G.E. Linthorst, A revised home treatment algorithm for Fabry disease: Influence of antibody formation, *Mol. Genet. Metab.* 108 (2013) 132–137. doi:10.1016/j.ymgme.2012.12.005.

- [31] P.B. Deegan, Fabry disease, enzyme replacement therapy and the significance of antibody responses, *J. Inherit. Metab. Dis.* 35 (2012) 227–243. doi:10.1007/s10545-011-9400-y.
- [32] M.L. West, C. Robin, J.T. Clarke, R.M. Iwanochko, D.F. Moore, S. Sirrs, Canadian Fabry disease treatment guidelines, (2012).
- [33] S.M. Sirrs, B. D.G., R. Casey, J.T.R. Clarke, K. Lemoine, S. Doucette, M.L. West, Outcomes of patients treated through the Canadian Fabry disease initiative, *Mol. Genet. Metab.* 111 (2014) 499–506.
- [34] R.J. Hopkin, G. Cabrera, J. Charrow, R. Lemay, A.M. Martins, M. Mauer, A. Ortiz, M.R. Patel, K. Sims, S. Waldek, D.G. Warnock, W.R. Wilcox, Risk factors for severe clinical events in male and female patients with Fabry disease treated with agalsidase beta enzyme replacement therapy: Data from the Fabry Registry, *Mol. Genet. Metab.* 119 (2016) 151–159. doi:10.1016/j.ymgme.2016.06.007.
- [35] C. Auray-Blais, D. Cyr, K. Mills, R. Giguère, R. Drouin, Development of a filter paper method potentially applicable to mass and high-risk urinary screenings for Fabry disease, *J. Inherit. Metab. Dis.* 30 (2007) 106. doi:10.1007/s10545-006-0444-3.
- [36] C. Auray-Blais, M. Boutin, Novel Gb₃ isoforms detected in urine of Fabry disease patients: a metabolomic study, *Curr. Med. Chem.* 19 (2012) 3241–52. doi:10.2174/092986712800784739.
- [37] P. Provençal, M. Boutin, S. Dworski, B. Au, J.A. Medin, C. Auray-Blais, Relative distribution of Gb₃ isoforms/analogs in NOD/SCID/Fabry mice tissues determined by tandem mass spectrometry, *Bioanalysis*. 8 (2016). doi:10.4155/bio-2016-0116.
- [38] K. Mills, P. Morris, P. Lee, A. Vellodi, S. Waldek, E. Young, B. Winchester, Measurement of urinary CDH and CTH by tandem mass spectrometry in patients hemizygous and heterozygous for Fabry disease, *J. Inherit. Metab. Dis.* 28 (2005) 35–48. doi:10.1007/s10545-005-5263-4.
- [39] V. Manwaring, M. Boutin, C. Auray-Blais, A metabolomic study to identify new globotriaosylceramide-related biomarkers in the plasma of Fabry disease patients, *Anal. Chem.* 85 (2013) 9039–9048. doi:10.1021/ac401542k.
- [40] H. Askari, C.R. Kaneski, C. Semino-Mora, P. Desai, A. Ang, D.E. Kleiner, L.T. Perlee, M. Quezado, L.E. Spollen, B.A. Wustman, R. Schiffmann, Cellular and tissue

- localization of globotriaosylceramide in Fabry disease, *Virchows Arch.* 451 (2007) 823–834. doi:10.1007/s00428-007-0468-6.
- [41] P. Rozenfeld, E. Agriello, N. De Francesco, P. Martinez, C. Fossati, Leukocyte perturbation associated with Fabry disease, *J. Inherit. Metab. Dis.* 32 Suppl 1 (2009) 67–77. doi:10.1007/s10545-009-1060-9.
- [42] Y. Benjamini, Y. Hochberg, Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing, *J. R. Stat. Soc. B.* 57 (1995) 289–300. doi:10.2307/2346101.
- [43] D. Cousineau, S. Chartier, Outliers detection and treatment: a review, *Int. J. Psychol. Res.* 3 (2010) 58–67. doi:10.1186/1471-2105-7-123.
- [44] C. Whybra, C. Kampmann, F. Krummenauer, M. Ries, E. Mengel, E. Miebach, F. Baehner, K. Kim, M. Bajbouj, A. Schwarting, A. Gal, M. Beck, The Mainz Severity Score Index: A new instrument for quantifying the Anderson - Fabry disease phenotype, and the response of patients to enzyme replacement therapy, *Clin. Genet.* 65 (2004) 299–307. doi:10.1111/j.1399-0004.2004.00219.x.
- [45] C. Auray-Blais, C.-M. Blais, U. Ramaswami, M. Boutin, D.P. Germain, S. Dyack, O. Bodamer, G. Pintos-Morell, J.T.R. Clarke, D.G. Bichet, D.G. Warnock, L. Echevarria, M.L. West, P. Lavoie, Urinary biomarker investigation in children with Fabry disease using tandem mass spectrometry, *Clin. Chim. Acta.* 438 (2015) 195–204. doi:10.1016/j.cca.2014.08.002.
- [46] D.P. Germain, La maladie de Fabry. Aspects cliniques et génétiques. Perspectives thérapeutiques, *Rev. Med. Interne.* 21 (2000) 1086–1103. doi:10.1016/S0248-8663(00)00269-1.
- [47] P. Parham, Le système immunitaire, *Boeck Super.* (2003) 406.

Supplementary Information

Supplementary Information Table S-1 (1)

Patient number	Age (years)	Gender	Mutation	Mutation type	ERT	Type ERT	Start of ERT	ERT antibody	α-gal A activity in patient leukocytes	α-gal A activity in control leukocyte
1	69	F	c. 877C>A; p. pro293thr	Missense	1	0	23-04-2012	1	9,00	78.00
2	23	M	c.1042G>C; p. Ala348pro	Missense	1	0	-	0	< 4.00	nd
3	55	F	c.1042G>C; p. Ala348pro	Missense	0	-	-	-	24.00	87.00
4	22	F	c. 658C>T; p.Arg220X	Nonsense	0	-	-	-	37.00	45.00-112.00
5	52	F	c. 658C>T; p.Arg220X	Nonsense	0	-	-	-	19.00	45.00-112.00
6	57	F	c. 101dupA; p. Asn34Iysfs*22	Frameshift	1	1	10-10-2013	0	nd	nd
7	68	F	c. 242G>C; p. Trp81ser	Missense	0	-	-	-	nd	nd
8	22	M	c.1042G>C; p. Ala348pro	Missense	1	0	04-03-2010	0	< 4.00	nd
9	57	M	c. 2T>C; p. met1>thr	Missense	1	0	12-09-2012	1	1.38	64.00
10	25	M	c.1042G>C; p. Ala348pro	Missense	0	-	-	-	1.00	99.00 (63.00-134.00)
11	58	F	c. 1241T>C; p. leu414ser	Missense	1	1	02-02-2011	0	68.00	86.00
12	24	M	c.1042G>C; p. Ala348pro	Missense	1	0	04-03-2010	0	< 4.00	nd
13	19	F	c. 994del; p. Arg332Asp fs*16	Frameshift	0	-	-	-	nd	nd
14	37	M	c. 644A>G; p. Asn215Ser	Missense	0	-	-	-	nd	nd
15	24	M	c. 658C>T; p.Arg220X	Nonsense	0	-	-	-	5.00	nd
16	48	F	c.1042G>C; p. Ala348pro	Missense	1	1	19-01-2015	0	24.00	83.00
17	34	F	c. 877C>A; p. pro293thr	Missense	0	-	-	-	61.00	107.00
18	33	M	Exon 2 C17-327 del	Deletion	0	-	-	1	4.00	120.00
19	61	M	c.950T>C p.Ile317Thr	Missense	1	1	28-07-2012	0	4.71	120.66
20	32	M	C.612G>A; Trp204X	Nonsense	1	1	26-07-2005	0	6.30	96.67
21	28	M	C.612G>A; Trp204X	Nonsense	1	1	26-07-2005	1	5.58	91.37

Supplementary Information Table S-1 (2)

Patient number	Serum creatinine (umol/L)	MDRD ou DFG (mL/min/1.73m2)	Urea (mmol/L)	Urinary proteines (g/24h)	Urinary Creatinine (mmol/24h)	Urinary albumine (mcg/min)	LVM index (g/m2)
1	85	57.59	6.7	0.067	8.12	8	114.8
2	70	121.37	5.0	0.200	12.66	47	89.2
3	57	95.63	4.2	0.150	8.86	27	121.5
4	65	98.99	3.6	0.230	15.45	63	42.9
5	71	75.00	4.5	nd	nd	nd	72.8
6	70	74.90	5.8	0.050	9.12	< 3	100.8
7	61	84.71	5.7	nd	9.5	nd	77.9
8	67	128.82	4.2	0.180	20.37	< 3	67.0
9	201	29.89	10.9	1.910	9.15	nd	106.3
10	79	103.79	3.6	0.290	10.95	20	71.9
11	96	51.84	6.8	4.440	8.12	nd	108.0
12	77	107.79	4.4	nd	nd	nd	82.0
13	56	121.11	3.3	0.127	nd	nd	55.0
14	73	112.00	nd	nd	nd	nd	72.2
15	72	116.48	5.9	0.090	12.89	21	76.0
16	94	55.20	5.3	0.140	13.00	< 6	68.0
17	70	83.19	5.9	0.140	11.92	60	73.6
18	94	80.27	6.8	1.390	0.21	nd	nd
19	92	77.20	4.8	0.230	7.79	nd	>15.0
20	94	85.74	4.2	0.280	13.44	nd	nd
21	107	81.63	5.3	3.120	0.24	nd	nd

Supplementary Information Table S-1 (3)

Patient number	Characteristic facial appearance	Angiokeratomas	Cornea verticillata	Musculoskeletal	Hypohidrosis or anhidrosis	Abdominal pain	Pulmonary (asthma and dyspnea)	Tinnitus	Acroparesthesia	Cerebrovascular	Fatigue
1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1
2	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0
3	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0
4	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
5	0	1	nd	0	0	1	0	0	0	0	0
6	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
7	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0
8	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1
9	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0
10	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0
11	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1
12	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0
13	0	0	nd	0	0	0	0	0	1	0	0
14	0	0	nd	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	1	nd	0	1	0	0	0	1	0	0
16	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
17	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0
18	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
19	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0
20	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1
21	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0

Supplementary Information Table S-1 (4)

Patient number	LVH	Valve insufficiency	ECG abnormalities	Pacemaker	Hypertension	Proteinuria
1	1	1	1	1	0	0
2	0	0	0	0	0	1
3	1	0	0	0	0	1
4	0	0	1	0	0	0
5	1	0	1	0	0	0
6	1	0	1	0	0	0
7	1	0	1	0	1	0
8	0	0	0	0	0	0
9	1	0	1	0	1	1
10	1	0	0	0	0	1
11	1	1	1	0	1	0
12	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0
14	0	0	1	0	0	0
15	1	0	0	0	0	1
16	0	0	1	0	0	1
17	0	0	0	0	0	1
18	0	0	0	0	0	1
19	1	0	1	0	0	1
20	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0

Supplementary Information Table S-2 (1)

Leukocytes (Response: Biomarker area/Internal standard area)

Gb ₃	Average leukocytes response 1	Average leukocytes response 2	Average leukocytes response 3	Average leukocytes response 4	Average leukocytes response 5	Average	Standard deviation	Coefficients of variation (%)
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]	1.648	1.492	1.929	1.701	1.95	1.744	0.195	11.2
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]	1.987	2.686	1.857	2.884	2.472	2.377	0.443	18.6
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]Me	0.310	0.398	0.296	0.399	0.391	0.359	0.052	14.4
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]	1.389	1.697	1.404	1.854	1.682	1.605	0.202	12.6
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]	1.590	1.878	1.665	1.966	1.838	1.787	0.155	8.7

Supplementary Information Table S-2 (2)

Leukocytes (Response: Biomarker area/Internal standard area)

Gb ₃	Average leukocytes response day 1	Average leukocytes response day 2	Average leukocytes response day 3	Average leukocytes response day 4	Average leukocytes response day 5	Average	Standard deviation	Coefficients of variation (%)
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]	1.744	1.554	2.013	1.951	1.361	1.725	0.272	15.8
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]	2.377	2.166	1.776	1.600	1.253	1.835	0.447	24.4
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]Me	0.359	0.351	0.310	0.270	0.202	0.299	0.064	21.6
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]	1.605	1.516	1.291	1.154	0.830	1.279	0.308	24.1
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]	1.787	1.664	1.705	1.554	1.169	1.576	0.243	15.4

Supplementary Information Table S-3 (1)

B lymphocytes (Response: Biomarker area/Internal standard area)

Gb ₃	Average B lymphocytes response 1	Average B lymphocytes response 2	Average B lymphocytes response 3	Average B lymphocytes response 4	Average B lymphocytes response 5	Average	Standard deviation	Coefficients of variation (%)
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]	0.608	0.460	0.407	0.436	0.388	0.46	0.0872	19,0
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]	13.456	10.160	7.961	9.337	8.054	9.793	2.244	22.9
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]Me	1.273	0.967	0.775	0.888	0.786	0.938	0.203	21.7
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]	27.704	21.424	17.364	19.831	17.341	20.733	4.265	20.6
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]	2.706	2.066	1.664	1.856	1.645	1.987	0.437	22.0

Supplementary Information Table S-3 (2)

B lymphocytes (Response: Biomarker area/Internal standard area)

Gb ₃	Average B lymphocytes response day 1	Average B lymphocytes response day 2	Average B lymphocytes response day 3	Average B lymphocytes response day 4	Average B lymphocytes response day 5	Average	Standard deviation	Coefficients of variation (%)
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]	0.46	0.331	0.364	0.533	0.353	0.408	0.085	20.9
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]	9.793	7.365	8.109	12.297	8.311	9.175	1.955	21.3
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]Me	0.938	0.716	0.762	1.139	0.776	0.866	0.174	20.1
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]	20.733	15.94	17.294	25.847	16.644	19.292	4.101	21.3
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]	1.987	1.514	1.676	2.512	1.638	1.865	0.401	21.5

Supplementary Information Table S-4 (1)

Monocytes (Response: Biomarker area/Internal standard area)

Gb ₃	Average monocytes response 1	Average monocytes response 2	Average monocytes response 3	Average monocytes response 4	Average monocytes response 5	Average	Standard deviation	Coefficients of variation (%)
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]	0.508	0.343	0.615	0.434	0.406	0.461	0.104	22.7
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]	9.058	6.943	8.885	8.195	7.812	8.179	0.856	10.5
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]Me	0.903	0.693	0.912	0.784	0.757	0.810	0.095	11.8
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]	18.985	14.998	19.122	17.952	16.856	17.583	1.709	9.7
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]	1.947	1.414	1.910	1.675	1.596	1.709	0.222	13.0

Supplementary Information Table S-4 (2)

Monocytes (Response: Biomarker area/Internal standard area)

Gb ₃	Average monocytes response day 1	Average monocytes response day 2	Average monocytes response day 3	Average monocytes response day 4	Average monocytes response day 5	Average	Standard deviation	Coefficients of variation (%)
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]	0.461	0.335	0.340	0.533	0.382	0.41	0.085	20.7
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]	8.179	7.678	7.688	12.559	8.902	9.001	2.051	22.8
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]Me	0.810	0.748	0.713	1.168	0.817	0.851	0.183	21.4
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]	17.583	16.517	16.625	26.389	17.702	18.963	4.186	22.1
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]	1.709	1.549	1.551	2.576	1.742	1.826	0.429	23.5

Supplementary Information Table S-5 (1)
Leukocytes (Response: Biomarker area/Internal standard area)

Gb₃ isoforms/analog	LOD response	LOD response
Gb ₃ [(d18:1)(C14:0)]	0.00071	0.00236
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]	0.00205	0.00683
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]Me	0.00197	0.00656
Gb ₃ [(d18:1)(C16:1)]	0.00135	0.00451
Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)]	0.00095	0.00315
Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)]Me	0.00426	0.01420
Gb ₃ [(d18:1)(C18:1)]	0.00073	0.00240
Gb ₃ [(d18:1)(C20:0)]	0.00152	0.00506
Gb ₃ [(d18:1)(C20:0)]Me	0.00702	0.02339
Gb ₃ [(d18:1)(C20:1)]	0.00084	0.00281
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]	0.00044	0.00147
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]Me	0.00121	0.00402
Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)]	0.00132	0.00440
Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)]Me	0.00077	0.00256
Gb ₃ [(d18:1)(C22:2)]	0.00125	0.00416
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]	0.00195	0.00651
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]Me	0.00111	0.00369
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]	0.00070	0.00233
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]Me	0.00718	0.02394
Gb ₃ [(d18:1)(C24:2)]	0.00181	0.00602
Gb ₃ [(d18:1)(C26:0)]	0.00577	0.01922
Gb ₃ [(d18:1)(C26:1)]	0.00154	0.00512

Supplementary Information Table S-5 (2)

B lymphocytes (Response: Biomarker area/Internal standard area)

Gb₃ isoforms/analog	LOD response	LOD response
Gb ₃ [(d18:1)(C14:0)]	0.00368	0.01227
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]	0.00256	0.00852
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]Me	0.00707	0.02357
Gb ₃ [(d18:1)(C16:1)]	0.00410	0.01368
Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)]	0.00520	0.01732
Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)]Me	0.00463	0.01543
Gb ₃ [(d18:1)(C18:1)]	0.00142	0.00474
Gb ₃ [(d18:1)(C20:0)]	0.00076	0.00254
Gb ₃ [(d18:1)(C20:0)]Me	0.00225	0.00751
Gb ₃ [(d18:1)(C20:1)]	0.00525	0.01751
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]	0.00402	0.01341
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]Me	0.00218	0.00727
Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)]	0.00318	0.01059
Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)]Me	0.00166	0.00552
Gb ₃ [(d18:1)(C22:2)]	0.00435	0.01450
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]	0.00576	0.01921
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]Me	0.00139	0.00464
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]	0.00416	0.01386
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]Me	0.00051	0.00170
Gb ₃ [(d18:1)(C24:2)]	0.00414	0.01380
Gb ₃ [(d18:1)(C26:0)]	0.01160	0.03867
Gb ₃ [(d18:1)(C26:1)]	0.00484	0.01613

Supplementary Information Table S-5 (3)

Monocytes (Response: Biomarker area/Internal standard area)

Gb₃ isoforms/analog	LOD response	LOD response
Gb ₃ [(d18:1)(C14:0)]	0.00156	0.00519
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]	0.00200	0.00668
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]Me	0.00665	0.02216
Gb ₃ [(d18:1)(C16:1)]	0.00216	0.00719
Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)]	0.00368	0.01225
Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)]Me	0.00483	0.01610
Gb ₃ [(d18:1)(C18:1)]	0.00115	0.00383
Gb ₃ [(d18:1)(C20:0)]	0.00074	0.00246
Gb ₃ [(d18:1)(C20:0)]Me	0.01092	0.03639
Gb ₃ [(d18:1)(C20:1)]	0.00043	0.00144
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]	0.00165	0.00552
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]Me	0.00242	0.00805
Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)]	0.05424	0.18080
Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)]Me	0.00058	0.00195
Gb ₃ [(d18:1)(C22:2)]	0.00595	0.01985
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]	0.00147	0.00489
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]Me	0.00135	0.00451
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]	0.00117	0.00390
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]Me	0.00035	0.00116
Gb ₃ [(d18:1)(C24:2)]	0.00368	0.01226
Gb ₃ [(d18:1)(C26:0)]	0.00039	0.00129
Gb ₃ [(d18:1)(C26:1)]	0.00071	0.00237

Supplementary Information Table S-6 (1)
Leukocytes (Response: Biomarker area/Internal standard area)

Patients	Gender	TER	Gb₃[(d18:1)(C14:0)] response	Gb₃[(d18:1)(C16:0)] response	Gb₃[(d18:1)(C16:0)]Me response	Gb₃[(d18:1)(C16:1)] response	Gb₃[(d18:1)(C18:0)] response	Gb₃[(d18:1)(C18:0)]Me response
P1	F	1	0.871	2.760	0.038	0.542	0.236	0.017
P2	M	1	0.688	3.146	0.041	0.537	0.250	0.007
P3	F	0	0.385	3.393	0.033	0.524	0.237	0.023
P4	F	0	1.137	5.392	0.050	0.671	0.775	0.051
P5	F	0	0.337	1.998	0.027	0.248	0.318	0.020
P6	F	1	1.088	4.320	0.040	0.725	0.283	0.023
P7	F	0	0.246	1.706	0.033	0.190	0.153	0.019
P8	M	1	0.468	2.320	0.028	0.364	0.224	0.011
P9	M	1	1.117	5.354	0.044	1.111	0.413	0.020
P10	M	0	1.646	5.355	0.059	1.323	0.532	0.019
P11	F	1	1.801	4.477	0.023	1.348	0.488	0.033
P12	M	1	1.004	4.056	0.045	0.670	0.576	0.046
P13	F	0	2.01	6.231	0.070	1.406	0.361	0.036
P14	M	0	0.642	1.716	0.019	0.416	0.133	0.008
P15	M	0	3.740	3.615	0.032	1.657	0.247	0.006
P16	F	1	0.465	2.040	0.029	0.347	0.241	0.017
P17	F	0	1.426	3.608	0.033	0.703	0.346	0.031
P18	M	0	0.798	3.314	0.045	0.670	0.335	0.009
P19	M	1	1.447	3.988	0.052	0.868	0.552	0.024
P20	M	1	1.277	5.645	0.054	0.869	0.393	0.014
P21	M	1	0.911	4.025	0.048	0.596	0.341	0.020

Supplementary Information Table S-6 (2)
Leukocytes (Response: Biomarker area/Internal standard area)

Patients	Gb₃[(d18:1)(C18:1)] response	Gb₃[(d18:1)(C20:0)] response	Gb₃[(d18:1)(C20:0)]Me response	Gb₃[(d18:1)(C20:1)] response	Gb₃[(d18:1)(C22:0)] response	Gb₃[(d18:1)(C22:0)]Me response
P1	0.134	0.081	0.010	0.064	0.239	0.094
P2	0.088	0.327	0.054	0.069	2.235	0.367
P3	0.095	0.565	0.059	0.090	3.155	0.780
P4	0.140	2.014	0.240	0.324	7.601	1.342
P5	0.074	0.797	0.093	0.148	3.388	0.642
P6	0.103	0.588	0.052	0.130	2.434	0.482
P7	0.048	0.383	0.047	0.065	1.632	0.280
P8	0.063	0.471	0.042	0.093	2.165	0.342
P9	0.192	0.329	0.032	0.118	0.863	0.186
P10	0.190	0.192	0.024	0.111	0.569	0.152
P11	0.204	0.797	0.099	0.200	2.333	0.519
P12	0.099	1.621	0.131	0.206	5.929	0.845
P13	0.158	0.757	0.081	0.214	3.012	0.714
P14	0.047	0.115	0.011	0.031	0.657	0.108
P15	0.086	0.248	0.034	0.063	0.994	0.262
P16	0.076	0.598	0.072	0.120	2.527	0.448
P17	0.113	0.862	0.077	0.139	2.718	0.577
P18	0.138	0.285	0.035	0.083	1.318	0.382
P19	0.262	0.423	0.035	0.118	1.196	0.263
P20	0.153	0.374	0.035	0.114	1.268	0.279
P21	0.111	0.396	0.046	0.118	1.712	0.360

Supplementary Information Table S-6 (3)
Leukocytes (Response: Biomarker area/Internal standard area)

Patients	Gb₃[(d18:1)(C22:1)] response	Gb₃[(d18:1)(C22:1)]Me response	Gb₃[(d18:1)(C22:2)] response	Gb₃[(d18:1)(C24:0)] response	Gb₃[(d18:1)(C24:0)]Me response	Gb₃[(d18:1)(C24:1)] response	Gb₃[(d18:1)(C24:1)]Me response
P1	0.194	0.049	0.029	0.294	0.023	0.758	0.017
P2	0.439	0.065	0.043	2.346	0.113	2.576	0.079
P3	0.736	0.087	0.099	3.365	0.247	3.012	0.098
P4	2.186	0.227	0.261	5.650	0.352	6.758	0.201
P5	0.874	0.125	0.090	3.046	0.143	3.089	0.089
P6	0.816	0.124	0.116	2.161	0.181	2.969	0.109
P7	0.507	0.081	0.053	1.413	0.054	1.639	0.041
P8	0.563	0.072	0.051	1.722	0.063	2.277	0.051
P9	0.485	0.066	0.086	1.012	0.071	1.896	0.047
P10	0.240	0.049	0.041	0.887	0.062	1.069	0.025
P11	0.955	0.114	0.136	2.084	0.181	2.748	0.127
P12	1.550	0.157	0.170	4.404	0.215	4.738	0.143
P13	1.176	0.160	0.170	2.519	0.266	3.955	0.166
P14	0.224	0.032	0.016	0.619	0.028	0.897	0.029
P15	0.334	0.069	0.041	1.146	0.063	1.461	0.044
P16	0.682	0.083	0.074	2.108	0.112	2.351	0.072
P17	0.893	0.112	0.109	2.894	0.178	3.077	0.086
P18	0.361	0.074	0.047	1.998	0.109	2.001	0.046
P19	0.622	0.068	0.076	1.156	0.086	1.881	0.077
P20	0.418	0.065	0.090	1.346	0.090	1.974	0.056
P21	0.523	0.087	0.081	1.688	0.091	2.038	0.063

Supplementary Information Table S-6 (4)

Leukocytes (Response: Biomarker area/Internal standard area)

Patients	Gb₃[(d18:1)(C24:2)] response	Gb₃[(d18:1)(C26:0)] response	Gb₃[(d18:1)(C26:1)] response	Ceramide[(d18:1)(C16:0)] response	Total Gb₃ response
P1	0.361	0.006	0.026	1.983	6.844
P2	0.525	0.092	0.134	1.611	14.222
P3	1.099	0.157	0.161	1.745	18.400
P4	1.604	0.23	0.329	4.530	37.535
P5	0.652	0.106	0.138	1.823	16.440
P6	0.734	0.101	0.105	3.698	17.683
P7	0.334	0.045	0.088	1.364	9.056
P8	0.485	0.072	0.074	1.657	12.02
P9	0.705	0.051	0.086	5.636	14.284
P10	0.384	0.041	0.033	2.165	13.003
P11	0.763	0.150	0.126	3.548	19.707
P12	1.140	0.200	0.202	2.452	28.148
P13	1.232	0.148	0.177	4.136	25.020
P14	0.219	0.026	0.024	2.97	6.016
P15	0.366	0.055	0.076	1.441	14.638
P16	0.553	0.091	0.088	1.712	13.198
P17	0.800	0.119	0.134	2.952	19.038
P18	0.484	0.084	0.076	0.921	12.693
P19	0.598	0.055	0.069	3.269	13.979
P20	0.565	0.058	0.093	2.411	15.232
P21	0.546	0.067	0.099	1.993	13.967

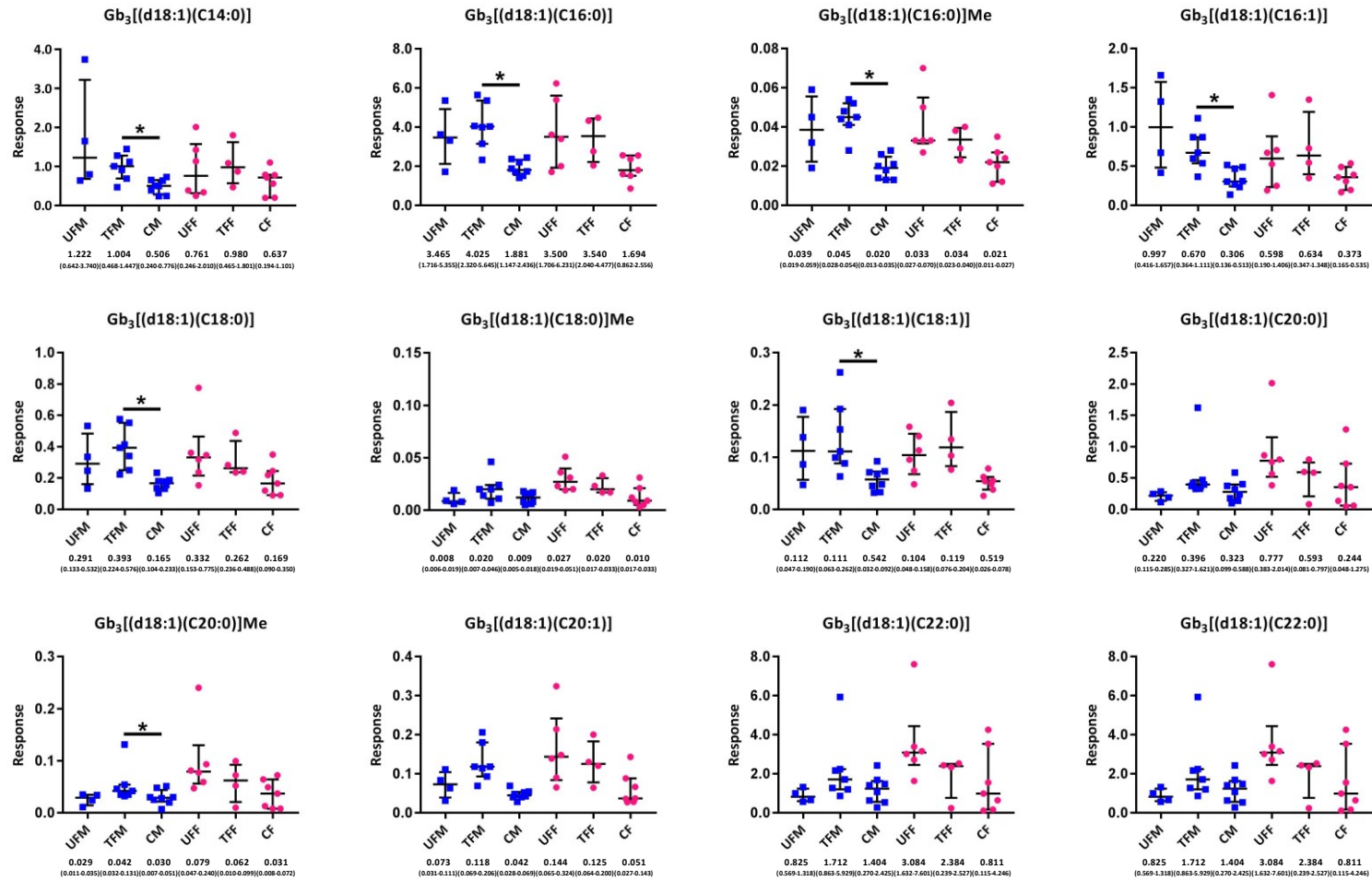
Supplementary Information Table S-7

Leukocytes Distributions (%)

Gb ₃	Untreated Fabry males (%)	Treated Fabry males (%)	Control males (%)	Untreated Fabry females (%)	Treated Fabry females (%)	Control females (%)
Gb ₃ [(d18:1)(C14:0)]	13.8	6.5	6.4	4.2	7.9	8.6
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]	30.1	26.8	25	17.9	25.7	24.2
Gb ₃ [(d18:1)(C16:1)]	8.4	4.7	4.5	2.9	5.4	4.8
Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)]	2.7	2.5	2.1	1.7	2.3	2.0
Gb ₃ [(d18:1)(C20:0)]	1.8	3.2	3.4	4.2	3.3	3.4
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]	8.1	12.9	13.8	17.1	12.1	12.7
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]	1.9	2.3	2.5	3.5*	2.5	2.5
Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)]	2.7*	3.9	4.8	5.1	4.4	4.8
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]	10.2	11.8	11	15.5	10.6	11.3
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]	12.2	15.5	15.6	17.2	14.9	14.9
Gb ₃ [(d18:1)(C24:2)]	3.2	4.1	4.2	4.5	4.4	4.2
Others	4.7	5.7	5.4	6.3	6.5	5.6
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]	0.3	0.3	0.3	0.2	0.3	0.3
Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)]	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1
Gb ₃ [(d18:1)(C18:1)]	1.0	0.9	0.8	0.5	1	0.7
Gb ₃ [(d18:1)(C20:0)]	0.2	0.3	0.4	0.5	0.4	0.3
Gb ₃ [(d18:1)(C20:1)]	0.6	0.8	0.6	0.8	0.9	0.6
Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)]	0.5*	0.5*	0.7	0.7	0.7	0.8
Gb ₃ [(d18:1)(C22:2)]	0.3*	0.5	0.5	0.6*	0.6	0.5
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]	0.6	0.6	0.6	1.0	0.8	0.6
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]	0.3	0.5	0.4	0.5	0.5	0.4
Gb ₃ [(d18:1)(C26:0)]	0.4	0.5	0.4	0.6	0.5	0.4
Gb ₃ [(d18:1)(C26:1)]	0.4	0.7	0.6	0.8	0.6	0.6

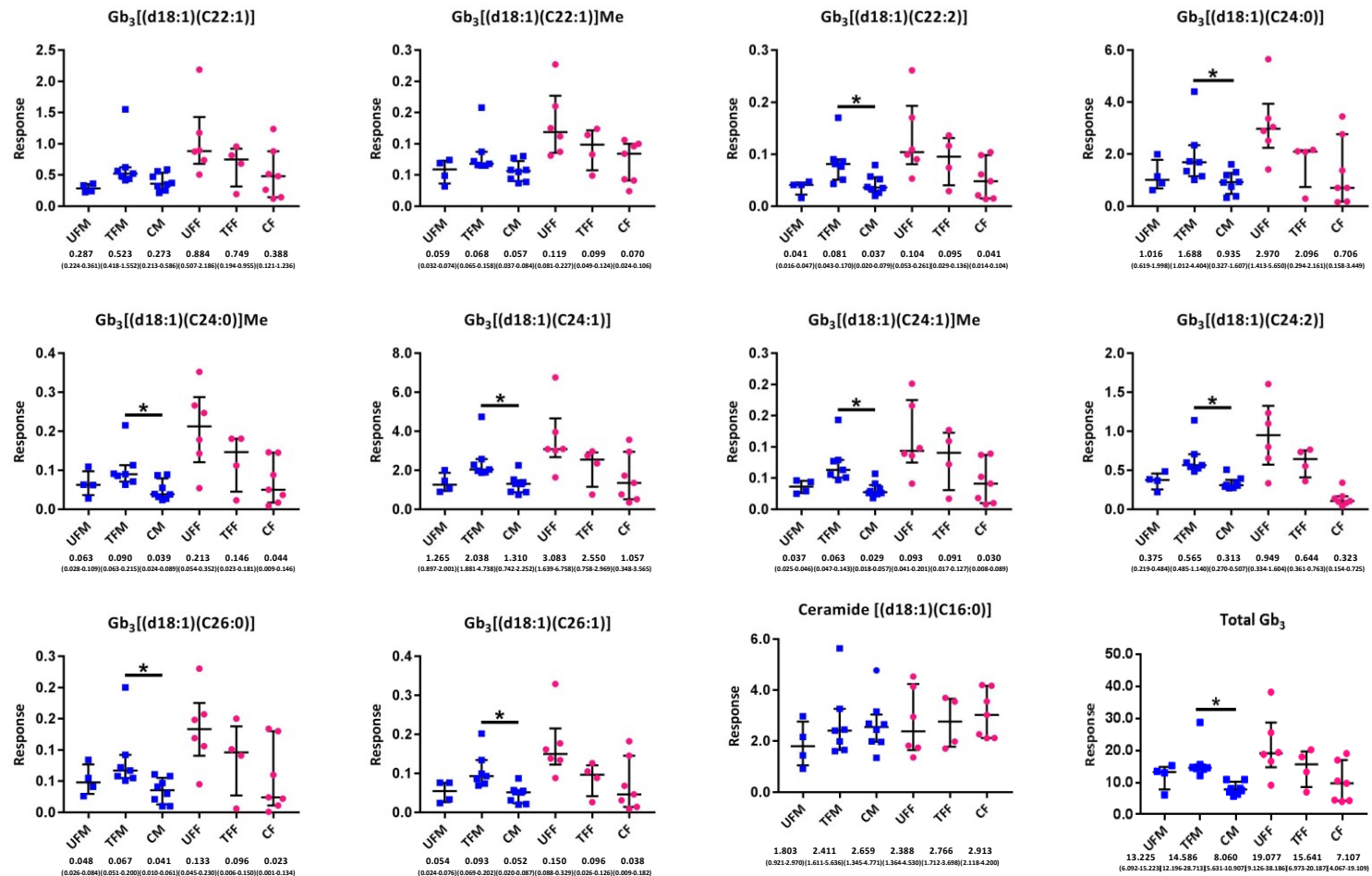
Supplementary Information Table S-8 (1)

Leukocytes (Response: Biomarker area/Internal standard area) in Fabry and control cohorts



Supplementary Information Table S-8 (2)

Leukocytes (Response: Biomarker area/Internal standard area) in Fabry and control cohorts



Supplementary Information Table S-9 (1)

B lymphocytes (Response: Biomarker area/Internal standard area)

Patients	Gender	TER	Gb₃[(d18:1)(C14:0)] response	Gb₃[(d18:1)(C16:0)] response	Gb₃[(d18:1)(C16:0)]Me response	Gb₃[(d18:1)(C16:1)] response	Gb₃[(d18:1)(C18:0)] response	Gb₃[(d18:1)(C18:0)]Me response
P1	F	1	nd	0.065	0.018	0.005	0.011	nd
P2	M	1	nd	0.077	0.020	0.007	0.015	nd
P3	F	0	nd	0.063	0.018	0.006	0.014	nd
P4	F	0	nd	0.079	0.020	nd	0.016	nd
P5	F	0	nd	0.079	0.020	0.006	0.017	nd
P6	F	1	nd	0.068	0.022	0.005	0.015	nd
P7	F	0	nd	0.068	0.019	0.006	0.016	nd
P8	M	1	nd	0.057	0.018	0.006	0.013	nd
P9	M	1	nd	0.066	0.019	0.006	0.014	nd
P10	M	0	nd	0.076	0.021	0.007	0.014	nd
P11	F	1	nd	0.06	0.020	nd	0.014	nd
P12	M	1	nd	0.069	0.020	0.006	0.015	nd
P13	F	0	nd	0.087	0.022	0.006	0.013	nd
P14	M	0	nd	0.067	0.016	0.006	0.013	nd
P15	M	0	nd	0.069	0.018	0.006	0.014	nd
P16	F	1	nd	0.057	0.017	0.005	0.012	nd
P17	F	0	nd	0.069	0.019	0.006	0.014	nd
P18	M	0	nd	0.054	0.018	0.004	0.011	nd
P19	M	1	nd	0.064	0.019	0.007	0.011	nd
P20	M	1	nd	0.064	0.021	0.005	0.013	nd
P21	M	1	nd	0.088	0.020	0.007	0.016	nd

Supplementary Information Table S-9 (2)

B lymphocytes (Response: Biomarker area/Internal standard area)

Patients	Gb ₃ [(d18:1)(C18:1)] response	Gb ₃ [(d18:1)(C20:0)] response	Gb ₃ [(d18:1)(C20:0)]Me response	Gb ₃ [(d18:1)(C20:1)] response	Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)] response	Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]Me response
P1	0.004	0.003	nd	nd	0.016	0.008
P2	0.005	0.003	nd	nd	0.030	0.010
P3	0.002	0.003	nd	nd	0.023	0.009
P4	0.003	0.010	nd	nd	0.069	0.014
P5	0.003	0.008	nd	nd	0.049	0.010
P6	0.003	0.004	nd	nd	0.020	0.008
P7	0.003	0.004	nd	nd	0.025	0.006
P8	0.003	0.002	nd	nd	0.019	0.007
P9	0.003	0.002	nd	nd	0.019	0.007
P10	0.005	0.003	nd	nd	0.023	0.009
P11	0.003	0.002	nd	nd	0.021	0.006
P12	0.004	0.010	nd	nd	0.050	0.010
P13	0.003	0.006	nd	nd	0.048	0.013
P14	0.003	0.003	nd	nd	0.021	0.009
P15	0.002	0.003	nd	nd	0.028	0.007
P16	0.002	0.003	nd	nd	0.024	0.007
P17	0.004	0.006	nd	nd	0.026	0.008
P18	0.002	0.002	nd	nd	0.015	0.006
P19	0.004	0.003	nd	nd	0.019	0.009
P20	0.003	0.003	nd	nd	0.021	0.007
P21	0.004	0.005	nd	nd	0.025	0.010

Supplementary Information Table S-9 (3)

B lymphocytes (Response: Biomarker area/Internal standard area)

Patients	Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)] response	Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)]Me response	Gb ₃ [(d18:1)(C22:2)] response	Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)] response	Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]Me response	Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)] response	Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]Me response
P1	0.006	0.002	nd	0.026	0.002	0.029	0.002
P2	0.009	0.004	nd	0.033	0.002	0.039	0.002
P3	0.007	0.003	nd	0.027	0.002	0.030	0.001
P4	0.015	0.003	nd	0.054	0.002	0.060	0.001
P5	0.012	0.004	nd	0.048	0.003	0.046	0.001
P6	0.005	0.002	nd	0.022	0.002	0.028	0.001
P7	0.008	0.004	nd	0.030	0.002	0.028	0.001
P8	0.008	0.002	nd	0.026	0.002	0.027	0.001
P9	0.005	0.002	nd	0.023	0.003	0.028	nd
P10	0.008	0.002	nd	0.041	0.003	0.031	0.001
P11	0.006	0.003	nd	0.038	0.003	0.046	0.001
P12	0.012	0.003	nd	0.051	0.004	0.048	0.002
P13	0.014	0.005	nd	0.051	0.004	0.069	0.002
P14	0.007	0.002	nd	0.021	nd	0.029	0.001
P15	0.008	0.003	nd	0.026	0.003	0.033	0.001
P16	0.010	0.003	nd	0.023	0.001	0.028	0.001
P17	0.009	0.003	nd	0.027	0.002	0.039	0.001
P18	0.005	nd	nd	0.023	nd	0.020	0.001
P19	0.007	0.002	nd	0.022	0.002	0.030	0.001
P20	0.007	0.003	nd	0.030	0.002	0.035	0.001
P21	0.009	0.004	nd	0.035	0.003	0.038	0.002

Supplementary Information Table S-9 (4)

B lymphocytes (Response: Biomarker area/Internal standard area)

Patients	Gb₃[(d18:1)(C24:2)] response	Gb₃[(d18:1)(C26:0)] response	Gb₃[(d18:1)(C26:1)] response	Ceramide[(d18:1)(C16:0)] response	Total Gb₃ response
P1	0.011	nd	nd	0.089	0.209
P2	0.009	nd	nd	0.100	0.265
P3	0.009	nd	nd	0.086	0.216
P4	0.012	nd	nd	0.082	0.359
P5	0.013	nd	nd	0.089	0.319
P6	0.008	nd	nd	0.099	0.212
P7	0.007	nd	nd	0.094	0.225
P8	0.007	nd	nd	0.076	0.199
P9	0.008	nd	nd	0.085	0.205
P10	0.012	nd	nd	0.092	0.257
P11	0.012	nd	nd	0.083	0.234
P12	0.010	nd	nd	0.091	0.314
P13	0.015	nd	nd	0.105	0.358
P14	0.010	nd	nd	0.092	0.206
P15	0.011	nd	nd	0.097	0.234
P16	0.011	nd	nd	0.043	0.205
P17	0.010	nd	nd	0.049	0.245
P18	0.006	nd	nd	0.059	0.166
P19	0.008	nd	nd	0.042	0.208
P20	0.007	nd	nd	0.038	0.221
P21	0.01	nd	nd	0.092	0.275

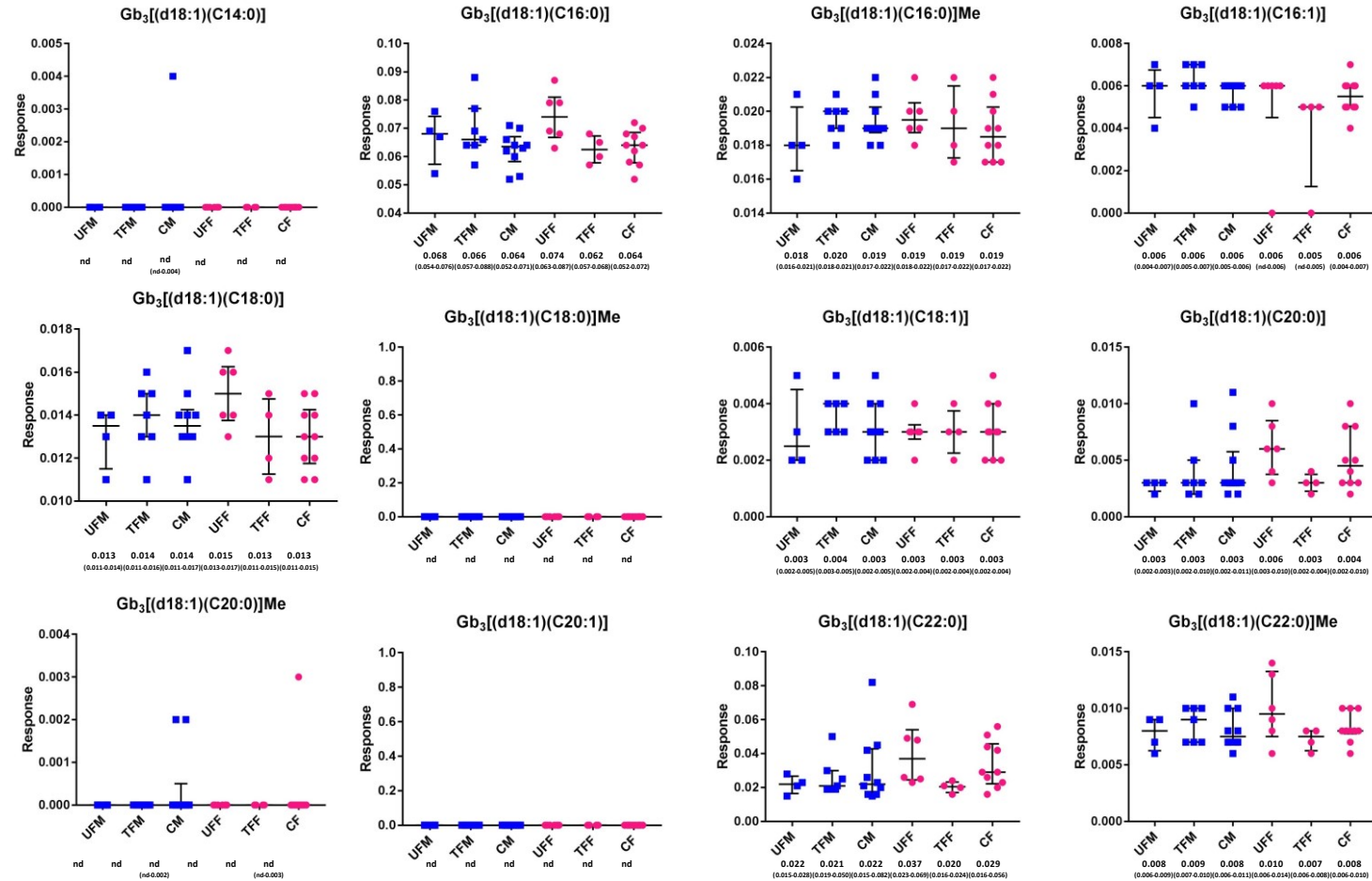
Supplementary Information Table S-10

B lymphocytes Distributions (%)

Gb₃	Untreated Fabry males (%)	Treated Fabry males (%)	Control males (%)	Untreated Fabry females (%)	Treated Fabry females (%)	Control females (%)
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]	31,0	29.1	27.2	26.4	29.2	26.5
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]Me	8.6	8.3	8.6	7.1	9,0	7.9
Gb ₃ [(d18:1)(C16:1)]	2.7	2.7	2.5	1.9	1.8	2.3
Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)]	6.1	5.8	6,0	5.5	6,0	5.4
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]	10,0	10.5	11.9	13.4	9.4	13.4
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]Me	3.6	3.6	3.5	3.5	3.4	3.4
Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)]	3.2	3.4	3.4	3.7	3.2	3.7
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]	12.8	12.8	12.4	13.5	12.6	12.9
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]	13.1	14.5	15,0	15.4	15.1	14.7
Gb ₃ [(d18:1)(C24:2)]	4.5	3.5	3.8	3.8	4.9	3.8
Others	4.5	5.9	5.8	5.8	5.5	5.9
Gb ₃ [(d18:1)(C14:0)]	0,0	0,0	0.2	0,0	0,0	0,0
Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)]Me	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Gb ₃ [(d18:1)(C18:1)]	1.4	1.6	1.4	1.1	1.4	1.3
Gb ₃ [(d18:1)(C20:0)]	1.3	1.6	1.7	2.1	1.4	2,0
Gb ₃ [(d18:1)(C20:0)]Me	0,0	0,0	0.1	0,0	0,0	0.1
Gb ₃ [(d18:1)(C20:1)]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)]Me	0.8	1.2	1,0	1.3	1.2	1.1
Gb ₃ [(d18:1)(C22:2)]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]Me	0.6	1.1	1,0	0.9	0.9	0.9
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]Me	0.5	0.5	0.4	0.4	0.6	0.5
Gb ₃ [(d18:1)(C26:0)]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Gb ₃ [(d18:1)(C26:1)]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

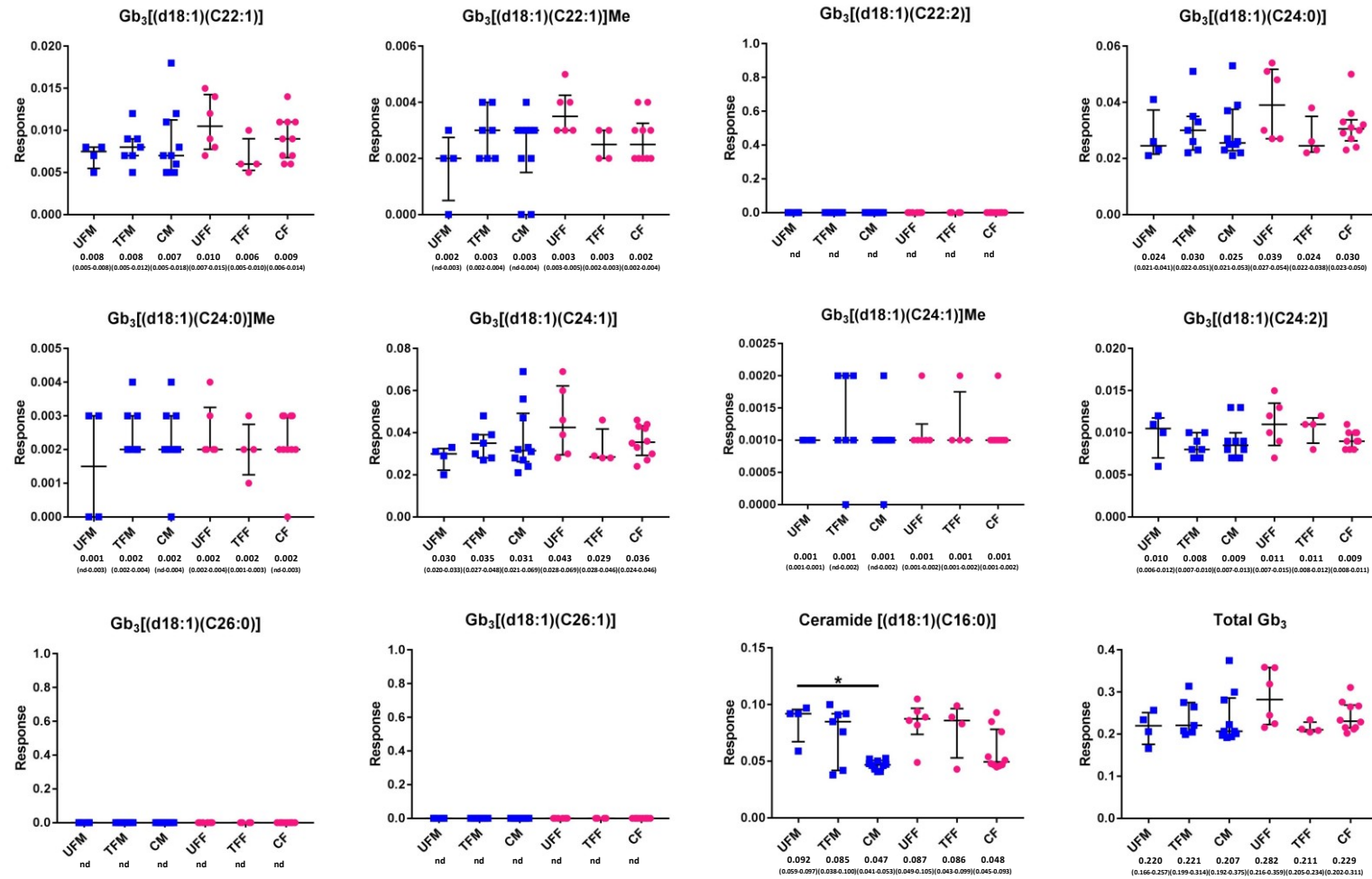
Supplementary Information Table S-11 (1)

B lymphocytes (Response: Biomarker area/Internal standard area) in Fabry and control cohorts



Supplementary Information Table S-11 (2)

B lymphocytes (Response: Biomarker area/Internal standard area) in Fabry and control cohorts



Supplementary Information Table S-12 (1)
Monocytes (Response: Biomarker area/Internal standard area)

Patients	Gender	TER	Gb ₃ [(d18:1)(C14:0)] response	Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)] response	Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]Me response	Gb ₃ [(d18:1)(C16:1)] response	Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)] response	Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)]Me response
P1	F	1	0.002	0.075	0.037	0.004	0.013	nd
P2	M	1	nd	0.063	0.040	0.008	0.013	nd
P3	F	0	nd	0.063	0.038	0.007	0.013	nd
P4	F	0	nd	0.055	0.036	0.005	0.011	nd
P5	F	0	nd	0.063	0.038	0.005	0.011	nd
P6	F	1	nd	0.059	0.041	0.004	0.012	nd
P7	F	0	nd	0.062	0.039	0.004	0.013	nd
P8	M	1	0.003	0.064	0.039	0.004	0.013	nd
P9	M	1	0.002	0.070	0.037	0.008	0.012	nd
P10	M	0	0.006	0.112	0.039	0.008	0.016	nd
P11	F	1	nd	0.059	0.037	0.004	0.009	nd
P12	M	1	0.002	0.078	0.033	0.006	0.014	nd
P13	F	0	0.002	0.062	0.040	0.005	0.012	nd
P14	M	0	nd	0.064	0.036	0.003	0.014	nd
P15	M	0	0.003	0.070	0.030	0.006	0.014	nd
P16	F	1	nd	0.051	0.039	0.004	0.008	nd
P17	F	0	0.004	0.080	0.034	0.006	0.017	nd
P18	M	0	0.002	0.074	0.031	0.006	0.015	nd
P19	M	1	nd	0.068	0.035	0.005	0.017	nd
P20	M	1	nd	0.076	0.038	0.004	0.012	nd
P21	M	1	0.010	0.150	0.037	0.008	0.020	nd

Supplementary Information Table S-12 (2)

Monocytes (Response: Biomarker area/Internal standard area)

Patients	Gb₃[(d18:1)(C18:1)] response	Gb₃[(d18:1)(C20:0)] response	Gb₃[(d18:1)(C20:0)]Me response	Gb₃[(d18:1)(C20:1)] response	Gb₃[(d18:1)(C22:0)] response	Gb₃[(d18:1)(C22:0)]Me response	Gb₃[(d18:1)(C22:1)] response
P1	0.003	0.001	nd	0.001	0.017	0.006	nd
P2	0.003	0.003	nd	nd	0.028	0.008	nd
P3	0.003	0.004	nd	nd	0.036	0.011	nd
P4	0.003	0.006	nd	0.001	0.037	0.011	nd
P5	0.002	0.012	nd	0.001	0.072	0.012	nd
P6	0.003	0.002	nd	nd	0.02	0.008	nd
P7	0.003	0.003	nd	nd	0.027	0.007	nd
P8	0.002	0.005	nd	0.001	0.033	0.007	nd
P9	0.003	0.003	nd	0.001	0.021	0.008	nd
P10	0.006	0.007	nd	0.001	0.05	0.013	nd
P11	nd	0.004	nd	nd	0.018	0.007	nd
P12	0.003	0.009	nd	0.001	0.06	0.010	nd
P13	0.004	0.003	nd	nd	0.025	0.006	nd
P14	0.001	0.002	nd	nd	0.019	0.009	nd
P15	0.003	0.004	nd	0.001	0.027	0.012	nd
P16	0.002	0.002	nd	0.001	0.026	0.006	nd
P17	0.003	0.008	nd	nd	0.049	0.010	nd
P18	0.006	0.004	nd	0.002	0.032	0.011	nd
P19	0.004	0.003	nd	nd	0.024	0.008	nd
P20	0.002	0.005	nd	nd	0.039	0.009	nd
P21	0.006	0.011	nd	nd	0.066	0.013	nd

Supplementary Information Table S-12 (3)

Monocytes (Response: Biomarker area/Internal standard area)

Patients	Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)]Me response	Gb ₃ [(d18:1)(C22:2)] response	Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)] response	Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]Me response	Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)] response	Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]Me response
P1	0.002	nd	0.028	0.001	0.027	0.001
P2	0.001	nd	0.043	0.002	0.035	nd
P3	0.002	nd	0.046	nd	0.042	nd
P4	0.003	nd	0.037	0.005	0.043	0.001
P5	0.002	nd	0.063	0.002	0.061	0.001
P6	0.002	nd	0.029	0.003	0.026	0.001
P7	0.002	nd	0.029	nd	0.031	nd
P8	0.003	nd	0.039	0.002	0.040	0.001
P9	0.002	nd	0.029	0.004	0.032	0.001
P10	0.003	nd	0.082	nd	0.054	nd
P11	0.002	nd	0.023	0.003	0.031	0.001
P12	0.002	nd	0.061	nd	0.064	0.001
P13	0.002	nd	0.031	0.004	0.038	0.001
P14	0.003	nd	0.028	nd	0.029	nd
P15	0.001	nd	0.043	0.003	0.036	nd
P16	0.002	nd	0.026	0.002	0.034	nd
P17	0.002	nd	0.056	nd	0.059	0.001
P18	0.005	nd	0.039	0.001	0.044	nd
P19	0.001	nd	0.030	0.004	0.036	0.001
P20	0.003	nd	0.052	0.001	0.050	nd
P21	0.003	nd	0.082	0.002	0.082	0.001

Supplementary Information Table S-12 (4)

Monocytes (Response: Biomarker area/Internal standard area)

Patients	Gb₃[(d18:1)(C24:2)] response	Gb₃[(d18:1)(C26:0)] response	Gb₃[(d18:1)(C26:1)] response	Ceramide[(d18:1)(C16:0)] response	Total Gb₃ response
P1	0.009	nd	nd	0.132	0.228
P2	0.010	0.001	0.002	0.117	0.258
P3	0.009	0.003	nd	0.140	0.277
P4	0.005	nd	0.001	0.115	0.259
P5	0.012	0.001	0.001	0.105	0.360
P6	0.010	0.001	nd	0.111	0.222
P7	0.009	nd	nd	0.134	0.230
P8	0.01	nd	0.002	0.133	0.268
P9	0.009	nd	nd	0.116	0.240
P10	0.011	0.002	0.001	0.135	0.413
P11	0.009	0.001	nd	0.100	0.207
P12	0.014	0.001	0.002	0.130	0.362
P13	0.007	0.001	nd	0.124	0.243
P14	0.008	nd	nd	0.115	0.216
P15	0.010	nd	nd	0.122	0.264
P16	0.008	0.001	nd	0.056	0.209
P17	0.010	0.002	nd	0.074	0.341
P18	0.010	0.001	nd	0.137	0.284
P19	0.004	nd	0.001	0.071	0.241
P20	0.008	0.001	0.001	0.076	0.299
P21	0.014	nd	0.002	0.173	0.507

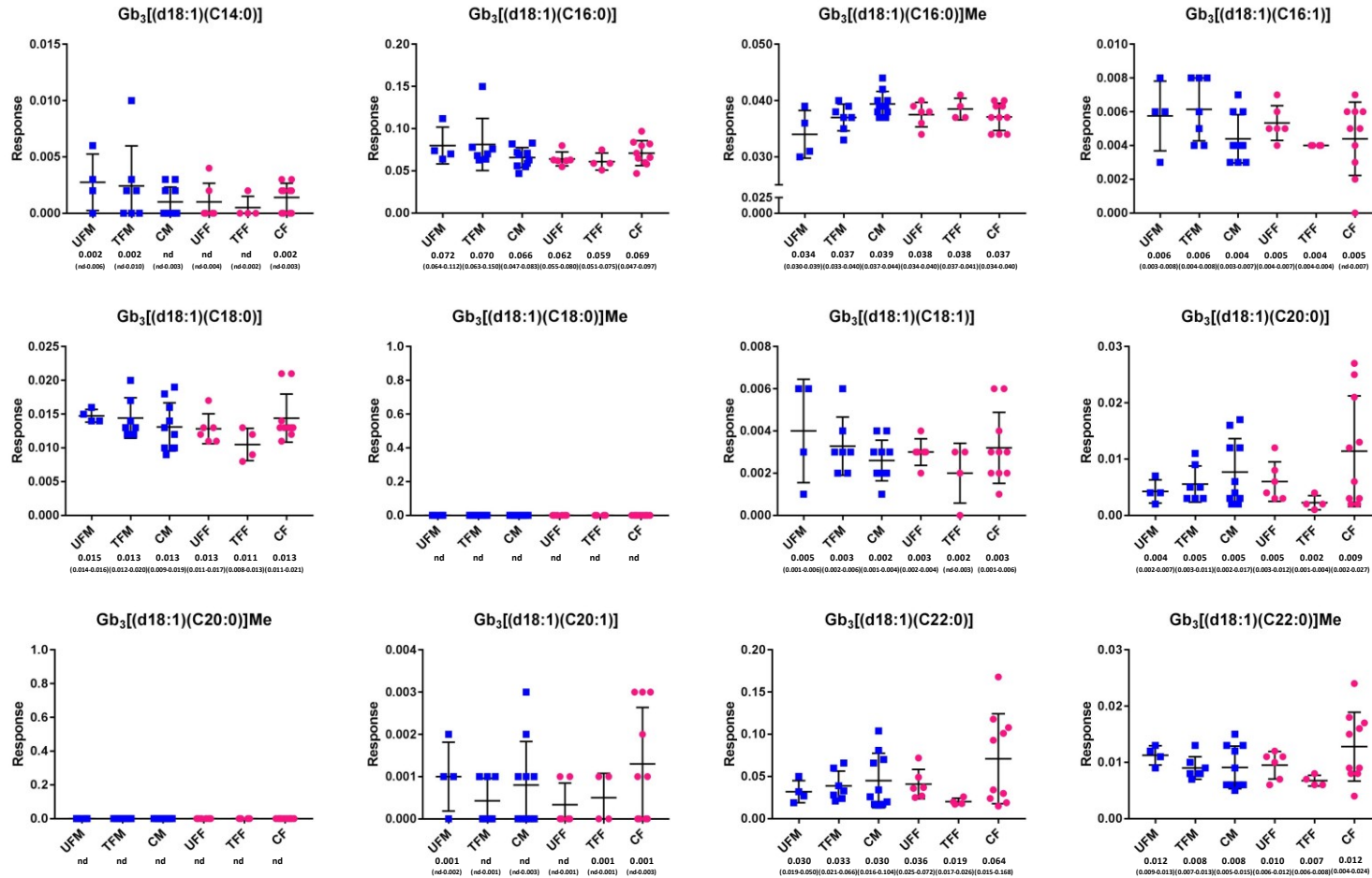
Supplementary Information Table S-13

Monocytes Distributions (%)

	Untreated Fabry males (%)	Treated Fabry males (%)	Control males (%)	Untreated Fabry females (%)	Treated Fabry females (%)	Control females (%)
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]	27.3	26,0	23.4	22.9	28.1	20.7
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]Me	12.1	12.7	14.7	13.6	17.8	11.5
Gb ₃ [(d18:1)(C16:1)]	1.9	2.1	1.6	1.9	1.9*	1.3
Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)]	5.2	4.8	4.5	4.6	4.8	4.3
Gb ₃ [(d18:1)(C20:0)]	1.4	1.7	2.3	2,0	1.1*	2.4
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]	10.6	12.1	13.4	13.9	9.4	15.9
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]Me	3.9*	3,0	3,0	3.3	3.1	3.3
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]	15.7	15.2	14.1	15,0	12.2*	16.6
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]	13.9	15.3	16.1	15.9	13.7*	17.2
Gb ₃ [(d18:1)(C24:2)]	3.4	3.2	3.4	3,0	4.2*	3.1
Others	4.2	4.2	3.6	3.8	4,0	3.7
Gb ₃ [(d18:1)(C14:0)]	0.8	0.6	0.3	0.3	0.2	0.4
Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)]Me	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Gb ₃ [(d18:1)(C18:1)]	1.3	1.1	0.9	1.1	0.9	0.9
Gb ₃ [(d18:1)(C20:0)]Me	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Gb ₃ [(d18:1)(C20:1)]	0.3	0.2	0.2	0.1	0.2	0.3
Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)]Me	1.1	0.7	0.9	0.8	0.9	0.8
Gb ₃ [(d18:1)(C22:2)]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]Me	0.4	0.8	0.6	0.7	1,0	0.4
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]Me	0,0	0.2	0.2	0.2	0.3	0.4
Gb ₃ [(d18:1)(C26:0)]	0.2	0.1	0.2	0.4	0.4	0.3
Gb ₃ [(d18:1)(C26:1)]	0.1	0.5	0.2	0.1	0,0	0.2

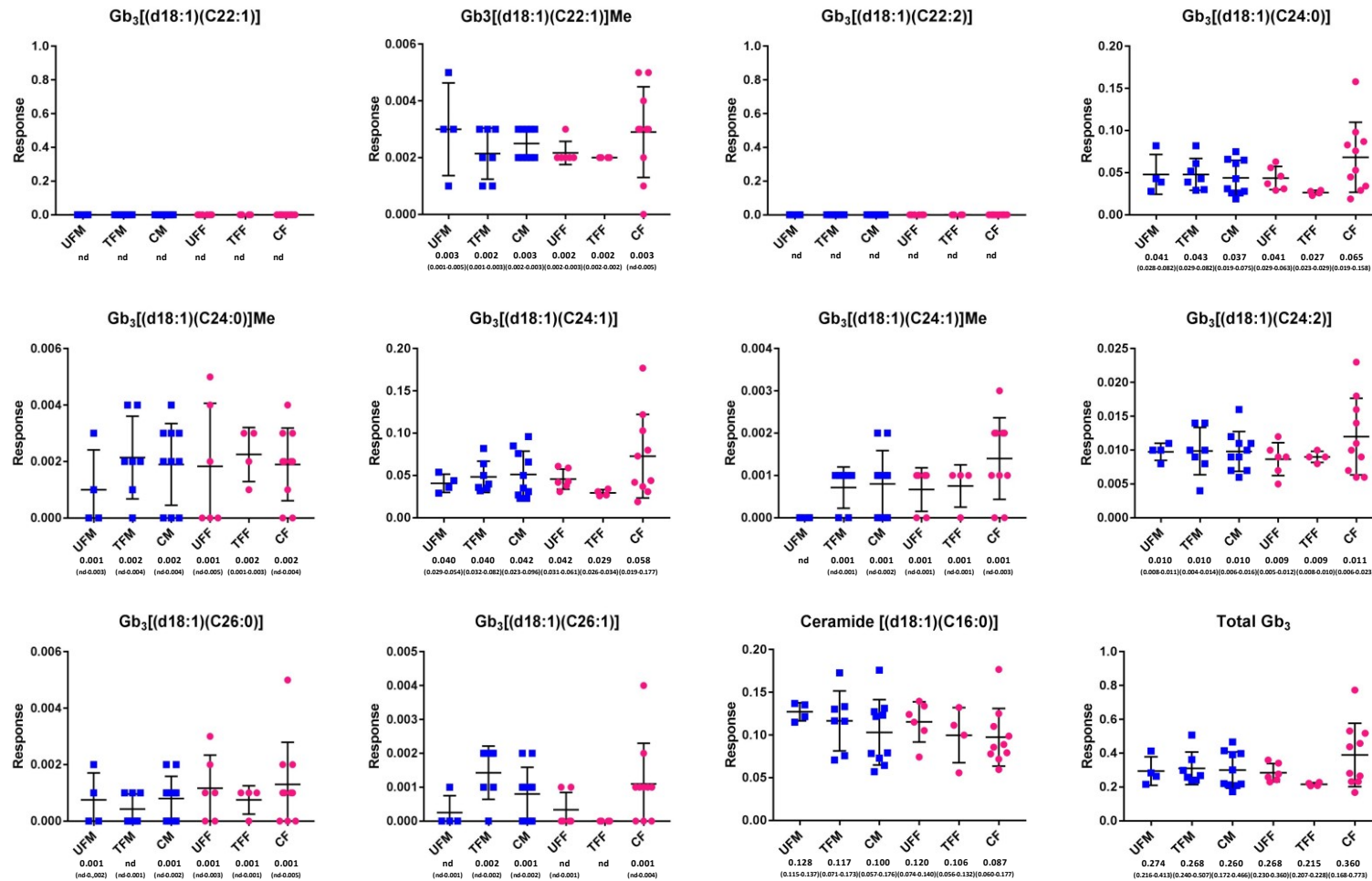
Supplementary Information Table S-14 (1)

Monocytes (Response: Biomarker area/Internal standard area) in Fabry and control cohorts



Supplementary Information Table S-14 (2)

Monocytes (Response: Biomarker area/Internal standard area) in Fabry and control cohorts



Supplementary Information Table S-15 (1)

Patients	Gender	TER	Plasma	Plasma	Plasma
			Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)] (μM)	Gb ₃ [(d18:1)(C16:1)] (μM)	Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)] (μM)
P1	F	1	3.42	0.41	0.35
P2	M	1	1.61	0.16	0.20
P3	F	0	1.67	0.24	0.21
P4	F	0	2.05	0.23	0.25
P5	F	0	1.74	0.27	0.25
P6	F	1	1.65	0.22	0.18
P7	F	0	1.64	0.23	0.21
P8	M	1	1.23	0.16	0.13
P9	M	1	2.13	0.30	0.43
P10	M	0	4.66	0.70	0.78
P11	F	1	3.29	0.41	0.40
P12	M	1	1.54	0.20	0.28
P13	F	0	1.68	0.17	0.17
P14	M	0	1.05	0.15	0.13
P15	M	0	4.29	0.63	0.44
P16	F	1	1.36	0.20	0.18
P17	F	0	1.64	0.23	0.21
P18	M	0	4.73	0.80	0.67
P19	M	1	1.72	0.21	0.59
P20	M	1	1.65	0.19	0.28
P21	M	1	2.84	0.27	0.42

Supplementary Information Table S-15 (2)

Patients	Plasma Gb₃[(d18:1)(C22:0)] (μM)	Plasma Gb₃[(d18:1)(C24:0)] (μM)	Plasma Gb₃[(d18:1)(C24:1)] (μM)	Plasma Total Gb₃ (μM)
P1	0.16	0.24	0.50	5.08
P2	0.28	0.41	0.71	3.37
P3	0.25	0.35	0.71	3.43
P4	0.32	0.38	0.71	3.94
P5	0.27	0.34	0.71	3.57
P6	0.21	0.25	0.51	3.01
P7	0.23	0.33	0.58	3.22
P8	0.16	0.27	0.45	2.40
P9	0.27	0.52	1.03	4.67
P10	0.50	0.96	1.14	8.74
P11	0.31	0.36	0.96	5.73
P12	0.24	0.39	0.63	3.27
P13	0.25	0.33	0.68	3.28
P14	0.12	0.24	0.39	2.07
P15	0.60	0.97	1.10	8.04
P16	0.18	0.24	0.49	2.65
P17	0.25	0.36	0.64	3.33
P18	0.80	1.49	1.67	10.16
P19	0.26	0.48	0.71	3.97
P20	0.26	0.51	0.78	3.66
P21	0.41	0.92	1.28	6.15

Supplementary Information Table S-16 (1)

Lyso-Gb₃ expressed as *m/z* and in bracket Δ with lyso-Gb₃ (AMU)

Patients	Gender	TER	Plasma Lyso-Gb ₃ 758 (-28) (nM)	Plasma Lyso-Gb ₃ 784 (-2) (nM)	Plasma Lyso-Gb ₃ 786 (nM)	Plasma Lyso-Gb ₃ 802 (+16) (nM)
P1	F	1	0.67	4.34	15.77	0.69
P2	M	1	0.21	1.72	11.36	nd
P3	F	0	0.06	2.55	9.57	0.95
P4	F	0	0.49	2.75	8.39	0.53
P5	F	0	0.9	3.44	12.69	0.36
P6	F	1	0.44	3.73	12.43	0.53
P7	F	0	0.28	4.25	15.07	1.28
P8	M	1	1.15	5.50	12.99	0.60
P9	M	1	1.76	17.87	52.22	26.71
P10	M	0	3.8	21.85	150.87	10.07
P11	F	1	0.21	3.24	12.55	2.71
P12	M	1	0.32	3.06	13.33	0.39
P13	F	0	nd	2.40	7.42	0.42
P14	M	0	0.08	1.45	3.95	nd
P15	M	0	9.47	23.08	140.97	7.01
P16	F	1	nd	1.29	3.31	nd
P17	F	0	0.27	1.90	5.76	0.42
P18	M	0	10.81	57.46	231.65	26.21
P19	M	1	1.44	14.45	41.87	9.39
P20	M	1	4.39	21.82	90.77	9.65
P21	M	1	1.33	6.41	32.40	1.87

Supplementary Information Table S-16 (2)

Lyso-Gb₃ expressed as *m/z* and in bracket Δ with lyso-Gb₃ (AMU)

Patients	Plasma Lyso-Gb₃ 804 (+18) (nM)	Plasma Lyso-Gb₃ 820 (+34) (nM)	Plasma Lyso-Gb₃ 836 (+50) (nM)	Plasma Total Lyso-Gb₃ (nM)
P1	1.20	0.39	nd	23.45
P2	1.42	0.27	nd	15.25
P3	1.28	0.37	nd	15.15
P4	0.89	0.08	nd	13.21
P5	1.32	0.11	nd	18.93
P6	1.02	0.22	nd	18.59
P7	1.33	0.34	nd	22.89
P8	1.05	0.04	nd	21.37
P9	4.95	7.61	1.94	120.67
P10	18.57	15.86	2.42	239.3
P11	0.88	nd	0.58	20.17
P12	1.27	0.22	nd	18.81
P13	0.90	nd	nd	11.14
P14	0.22	nd	nd	5.7
P15	21.91	19	2.42	242.86
P16	nd	nd	nd	4.6
P17	0.49	0.10	nd	9.04
P18	36.32	41.24	7.66	452.59
P19	2.86	2.55	0.31	75.42
P20	13.18	8.64	1.07	158.16
P21	3.75	1.53	nd	48.82

Supplementary Information Table S-17 (1)

Patients	Gender	TER	Urine Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)]Me (μmol/mmol of creatinine)	Urine Gb ₃ [(d18:1)(C20:0)]Me (μmol/mmol of creatinine)	Urine Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)]Me (μmol/mmol of creatinine)	Urine Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]Me (μmol/mmol of creatinine)
P1	F	1	nd	nd	nd	nd
P2	M	1	0.03	0.04	0.09	0.16
P3	F	0	0.42	0.51	1.35	1.85
P4	F	0	0.20	0.31	0.53	1.03
P5	F	0	0.35	0.47	0.58	1.45
P6	F	1	nd	nd	nd	nd
P7	F	0	nd	nd	nd	nd
P8	M	1	nd	nd	nd	0.06
P9	M	1	3.85	5.12	5.59	17.43
P10	M	0	1.52	2.09	2.56	7.48
P11	F	1	0.18	0.32	0.3	1.12
P12	M	1	nd	nd	nd	nd
P13	F	0	0.14	0.22	0.30	1.01
P14	M	0	nd	nd	nd	0.07
P15	M	0	1.82	2.42	3.06	7.11
P16	F	1	0	nd	0.04	0.09
P17	F	0	0.22	0.29	0.42	0.76
P18	M	0	3.14	4.58	5.04	15.91
P19	M	1	nd	0.28	nd	nd
P20	M	1	3.08	4.38	5.77	16.28
P21	M	1	nd	nd	0.09	0.27

Supplementary Information Table S-17 (2)

Patients	Urine Gb₃[(d18:1)(C24:1)]Me (μmol/mmol of creatinine)	Urine Gb₃[(d18:1)(C24:0)]Me (μmol/mmol of creatinine)	Urine Gb₃[(d18:1)(C16:0)] (μmol/mmol of creatinine)	Urine Gb₃[(d18:1)(C18:0)] (μmol/mmol of creatinine)	Urine Gb₃[(d18:1)(C20:0)] (μmol/mmol of creatinine)
P1	nd	nd	0.49	nd	0.12
P2	nd	0.03	1.73	0.13	0.31
P3	0.44	0.25	25.05	1.9	3.62
P4	0.22	0.14	10.63	1.05	1.79
P5	0.25	0.19	6.10	1.69	2.95
P6	nd	nd	nd	nd	nd
P7	nd	nd	nd	nd	nd
P8	nd	nd	0.44	0.07	0.12
P9	3.36	2.17	71.71	27.38	43.56
P10	1.95	0.89	35.62	9.72	18.79
P11	nd	nd	4.28	1.03	2.24
P12	nd	nd	1.27	0.10	0.26
P13	0.19	0.22	5.77	0.65	1.64
P14	nd	nd	0.53	0.06	0.13
P15	2.28	0.76	37.28	11.31	18.42
P16	nd	nd	0.85	0.10	0.17
P17	0.15	0.10	5.67	1.01	1.77
P18	3.77	1.52	76.26	19.34	37.54
P19	nd	nd	3.26	0.29	0.67
P20	3.62	1.71	51.13	16.65	30.16
P21	nd	nd	2.70	0.17	0.58

Supplementary Information Table S-17 (3)

Patients	Urine Gb₃[(d18:1)(C22:1)] (μmol/mmol of creatinine)	Urine Gb₃[(d18:1)(C22:0)] (μmol/mmol of creatinine)	Urine Gb₃[(d18:1)(C24:1)] (μmol/mmol of creatinine)
P1	nd	0.36	0.43
P2	0.21	1.07	2.33
P3	3.12	9.87	32.2
P4	1.21	5.43	10.66
P5	1.62	7.74	9.97
P6	nd	nd	nd
P7	nd	nd	nd
P8	0.07	0.43	0.49
P9	21.94	nd	nd
P10	10.19	64.78	nd
P11	1.04	5.84	5.46
P12	nd	0.75	0.76
P13	0.74	5.33	9.22
P14	0.07	0.43	0.62
P15	9.50	54.69	nd
P16	0.12	0.58	0.91
P17	1.18	4.63	7.04
P18	20.41	104.75	139.02
P19	0.34	1.94	2.36
P20	17.09	83.91	nd
P21	0.27	1.98	2.68

Supplementary Information Table S-17 (4)

Patients	Urine Gb₃[(d18:1)(C24:0)] (μmol/mmol of creatinine)	Urine Gb₃[(d18:1)(C24:0)OH] (μmol/mmol of creatinine)	Urine Total Gb₃ (μmol/mmol of creatinine)
P1	0.45	nd	1.84
P2	1.11	nd	7.24
P3	15.16	0.46	96.23
P4	8.11	0.18	41.48
P5	11.06	nd	44.41
P6	nd	nd	nd
P7	nd	nd	nd
P8	0.54	nd	2.22
P9	nd	2.17	204.29
P10	nd	1.58	157.18
P11	7.55	nd	29.35
P12	0.70	nd	3.84
P13	8.74	0.25	34.42
P14	0.58	nd	2.49
P15	nd	1.35	150
P16	0.83	nd	3.7
P17	6.27	nd	29.5
P18	209.76	1.97	643.01
P19	2.09	nd	11.23
P20	nd	2.12	235.89
P21	2.17	nd	10.92

Supplementary Information Table S-18 (1)

Lyso-Gb₃ expressed as *m/z* and in bracket Δ with lyso-Gb₃ (AMU)

Patients	Gender	TER	Urine Lyso-Gb ₃ 758 (-28) (pmol/mmol of creatinine)	Urine Lyso-Gb ₃ 774 (-12) (pmol/mmol of creatinine)	Urine Lyso-Gb ₃ 784 (-2) (pmol/mmol of creatinine)	Urine Lyso-Gb ₃ 786 (pmol/mmol of creatinine)
P1	F	1	19.60	651.65	64.66	97.39
P2	M	1	185.25	319.28	209.17	576.22
P3	F	0	178.90	556.39	486.73	3110.35
P4	F	0	236.46	1359.57	288.49	1113.30
P5	F	0	357.86	1037.66	348.40	228.60
P6	F	1	nd	nd	nd	nd
P7	F	0	nd	nd	nd	nd
P8	M	1	272.45	2109.05	307.78	56.66
P9	M	1	749.37	3913.37	2312.40	3082.90
P10	M	0	339.62	3978.79	708.79	2009.51
P11	F	1	122.72	227.76	243.78	301.55
P12	M	1	nd	208.42	21.94	59.67
P13	F	0	89.32	686.22	165.76	167.73
P14	M	0	64.54	691.85	42.60	nd
P15	M	0	2425.97	11049.63	2095.57	2971.91
P16	F	1	nd	318.60	23.70	150.34
P17	F	0	123.44	802.34	125.59	396.11
P18	M	0	1399.76	4372.20	3620.67	2525.96
P19	M	1	52.56	868.50	183.84	126.37
P20	M	1	153.15	1032.20	190.35	428.82
P21	M	1	1550.72	3404.62	3673.65	4524.96

Supplementary Information Table S-18 (2)

Lyso-Gb₃ expressed as *m/z* and in bracket Δ with lyso-Gb₃ (AMU)

Patients	Urine Lyso-Gb₃ 800 (+14) (pmol/mmol of creatinine)	Urine Lyso-Gb₃ 802 (+16) (pmol/mmol of creatinine)	Urine Lyso-Gb₃ 820 (+34) (pmol/mmol of creatinine)	Urine Lyso-Gb₃ 836 (+50) (pmol/mmol of creatinine)	Total Lyso-Gb₃ (pmol/mmol of creatinine)
P1	118.82	761.82	571.86	496.12	2781.92
P2	108.94	820.98	843.80	514.62	3578.26
P3	180.60	1369.23	1095.40	671.42	7649.02
P4	347.26	2110.16	1139.25	659.25	7253.74
P5	221.56	1475.26	1072.41	410.62	5152.40
P6	nd	nd	nd	nd	nd
P7	nd	nd	nd	nd	nd
P8	567.98	2802.07	1169.31	799.03	8084.33
P9	3085.28	15514.33	6130.50	3258.2	38046.35
P10	1611.79	6680.73	4709.21	7898.52	27936.96
P11	89.19	831.75	334.37	97.81	2248.93
P12	50.55	498.25	282.94	172.57	1294.34
P13	236.55	1273.32	776.50	505.99	3901.39
P14	141.06	949.31	619.22	524.92	3033.50
P15	3028.19	12195.78	9219.31	14410.35	57396.71
P16	59.20	456.12	211.82	307.44	1527.22
P17	176.40	1092.3	660.33	393.99	3770.50
P18	2222.38	11156.72	5829.5	9819.25	40946.44
P19	468.26	3859.44	974.83	978.04	7511.84
P20	270.24	2045.67	1312.36	782.54	6215.33
P21	1439.60	9037.93	4513.36	3717.61	31862.45

Supplementary Information Table S-19 (1)
B lymphocytes in untreated and treated Fabry cohorts

	Area Under the Curve		Asymptotic 95% Confidence Intervals		Asymptotic Significance	
	Untreated Fabry males	Treated Fabry males	Untreated Fabry males	Treated Fabry males	Untreated Fabry males	Treated Fabry males
Gb ₃ [(d18:1)(C14:0)]	0.450	0.455	0.127-0.782	0.180-0.729	0.794	0.751
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]	0.705	0.688	0.363-1.000	0.430-0.947	0.240	0.189
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]Me	0.318	0.636	0.000-0.690	0.370-0.903	0.296	0.342
Gb ₃ [(d18:1)(C16:1)]	0.568	0.870	0.152-0.984	0.683-1.000	0.695	0.010*
Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)]	0.341	0.571	0.037-0.645	0.276-0.867	0.361	0.618
Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)]Me	-	-	-	-	-	-
Gb ₃ [(d18:1)(C18:1)]	0.409	0.701	0.015-0.803	0.456-0.946	0.602	0.160
Gb ₃ [(d18:1)(C20:0)]	0.432	0.506	0.139-0.725	0.220-0.793	0.695	0.964
Gb ₃ [(d18:1)(C20:0)]Me	0.409	0.409	0.097-0.721	0.142-0.676	0.602	0.526
Gb ₃ [(d18:1)(C20:1)]	-	-	-	-	-	-
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]	0.386	0.494	0.069-0.703	0.217-0.770	0.514	0.964
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]Me	0.409	0.558	0.046-0.772	0.283-0.833	0.602	0.684
Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)]	0.500	0.597	0.145-0.855	0.314-0.881	1.000	0.497
Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)]Me	0.273	0.584	0.007-0.539	0.307-0.861	0.192	0.556
Gb ₃ [(d18:1)(C22:2)]	-	-	-	-	-	-
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]	0.432	0.532	0.070-0.794	0.250-0.815	0.695	0.821
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]Me	0.432	0.571	0.025-0.838	0.295-0.848	0.695	0.618
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]	0.386	0.545	0.063-0.710	0.268-0.823	0.514	0.751
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]Me	0.341	0.552	0.053-0.629	0.255-0.849	0.361	0.717
Gb ₃ [(d18:1)(C24:2)]	0.614	0.506	0.224-1.000	0.216-0.797	0.514	0.964
Gb ₃ [(d18:1)(C26:0)]	-	-	-	-	-	-
Gb ₃ [(d18:1)(C26:1)]	-	-	-	-	-	-
Ceramide [(d18:1)(C16:0)]	1.000	0.740	1.000-1.000	0.431-1.000	0.004*	0.094
Total Gb ₃	0.455	0.584	0.102-0.807	0.317-0.852	0.794	0.556

Supplementary Information Table S-19 (2)
B lymphocytes in untreated and treated Fabry cohorts

	Area Under the Curve		Asymptotic 95% Confidence Intervals		Asymptotic Significance	
	Untreated Fabry females	Treated Fabry females	Untreated Fabry females	Treated Fabry females	Untreated Fabry females	Treated Fabry females
Gb ₃ [(d18:1)(C14:0)]	0.500	0.500	0.192-0.808	0.147-0.853	1.000	1.000
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]	0.815	0.472	0.592-1.000	0.146-0.799	0.045*	0.877
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]Me	0.648	0.528	0.364-0.932	0.173-0.882	0.346	0.877
Gb ₃ [(d18:1)(C16:1)]	0.574	0.167	0.258-0.891	0.000-0.391	0.637	0.064
Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)]	0.852	0.500	0.655-1.000	0.157-0.843	0.025*	1.000
Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)]Me	-	-	-	-	-	-
Gb ₃ [(d18:1)(C18:1)]	0.611	0.667	0.314-0.908	0.347-0.986	0.480	0.355
Gb ₃ [(d18:1)(C20:0)]	0.593	0.250	0.286-0.899	0.000-0.519	0.556	0.165
Gb ₃ [(d18:1)(C20:0)]Me	0.444	0.444	0.144-0.745	0.107-0.792	0.724	0.758
Gb ₃ [(d18:1)(C20:1)]	-	-	-	-	-	-
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]	0.574	0.167	0.264-0.884	0.000-0.391	0.637	0.064
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]Me	0.722	0.250	0.414-1.000	0.000-0.522	0.157	0.165
Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)]	0.667	0.167	0.367-0.966	0.000-0.428	0.289	0.064
Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)]Me	0.778	0.472	0.539-1.000	0.159-0.785	0.077	0.877
Gb ₃ [(d18:1)(C22:2)]	-	-	-	-	-	-
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]	0.667	0.306	0.368-0.965	0.000-0.676	0.289	0.280
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]Me	0.556	0.500	0.224-0.887	0.148-0.852	0.724	1.000
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]	0.648	0.389	0.337-0.959	0.025-0.753	0.346	0.537
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]Me	0.352	0.472	0.045-0.659	0.065-0.880	0.346	0.877
Gb ₃ [(d18:1)(C24:2)]	0.704	0.694	0.392-1.000	0.283-1.000	0.195	0.280
Gb ₃ [(d18:1)(C26:0)]	-	-	-	-	-	-
Gb ₃ [(d18:1)(C26:1)]	-	-	-	-	-	-
Ceramide [(d18:1)(C16:0)]	0.852	0.667	0.655-1.000	0.261-1.000	0.025*	0.355
Total Gb ₃	0.704	0.250	0.412-0.995	0.000-0.532	0.195	0.165

Supplementary Information Table S-20 (1)
Monocytes in untreated and treated Fabry cohorts

	Area Under the Curve		Asymptotic 95% Confidence Intervals		Asymptotic Significance	
	Untreated Fabry males	Treated Fabry males	Untreated Fabry males	Treated Fabry males	Untreated Fabry males	Treated Fabry males
Gb ₃ [(d18:1)(C14:0)]	0.705	0.545	0.378-1.000	0.260-0.831	0.240	0.751
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]	0.727	0.662	0.452-1.000	0.408-0.917	0.192	0.258
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]Me	0.159	0.325	0.000-0.410	0.066-0.584	0.050*	0.221
Gb ₃ [(d18:1)(C16:1)]	0.705	0.792	0.391-1.000	0.574-1.000	0.240	0.042*
Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)]	0.750	0.610	0.500-1.000	0.344-0.876	0.151	0.441
Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)]Me	-	-	-	-	-	-
Gb ₃ [(d18:1)(C18:1)]	0.682	0.675	0.272-1.000	0.414-0.937	0.296	0.221
Gb ₃ [(d18:1)(C20:0)]	0.477	0.455	0.175-0.780	0.183-0.727	0.896	0.751
Gb ₃ [(d18:1)(C20:0)]Me	-	-	-	-	-	-
Gb ₃ [(d18:1)(C20:1)]	0.682	0.481	0.363-1.000	0.202-0.759	0.296	0.892
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]	0.477	0.519	0.188-0.766	0.246-0.793	0.896	0.892
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]Me	0.614	0.571	0.344-0.893	0.298-0.845	0.514	0.618
Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)]	-	-	-	-	-	-
Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)]Me	0.614	0.338	0.221-1.000	0.073-0.602	0.514	0.258
Gb ₃ [(d18:1)(C22:2)]	-	-	-	-	-	-
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]	0.545	0.558	0.205-0.886	0.283-0.833	0.794	0.684
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]Me	0.295	0.526	0.009-0.582	0.238-0.814	0.240	0.856
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]	0.477	0.532	0.188-0.766	0.259-0.806	0.896	0.821
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]Me	0.182	0.468	0.000-0.398	0.193-0.742	0.068	0.821
Gb ₃ [(d18:1)(C24:2)]	0.545	0.468	0.241-0.850	0.177-0.758	0.794	0.821
Gb ₃ [(d18:1)(C26:0)]	0.500	0.377	0.142-0.858	0.110-0.643	1.000	0.390
Gb ₃ [(d18:1)(C26:1)]	0.341	0.636	0.007-0.675	0.366-0.907	0.361	0.342
Ceramide [(d18:1)(C16:0)]	0.727	0.597	0.455-1.000	0.322-0.873	0.192	0.497
Total Gb ₃	0.523	0.584	0.218-0.827	0.309-0.859	0.896	0.556

Supplementary Information Table S-20 (2)
Monocytes in untreated and treated Fabry cohorts

	Area Under the Curve		Asymptotic 95% Confidence Intervals		Asymptotic Significance	
	Untreated Fabry females	Treated Fabry females	Untreated Fabry females	Treated Fabry females	Untreated Fabry females	Treated Fabry females
Gb ₃ [(d18:1)(C14:0)]	0.389	0.278	0.077-0.701	0.000-0.556	0.480	0.217
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]	0.333	0.278	0.047-0.620	0.000-0.565	0.289	0.217
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]Me	0.519	0.556	0.207-0.830	0.203-0.908	0.906	0.758
Gb ₃ [(d18:1)(C16:1)]	0.556	0.333	0.253-0.858	0.025-0.641	0.724	0.355
Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)]	0.370	0.167	0.053-0.688	0.000-0.406	0.409	0.064
Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)]Me	-	-	-	-	-	-
Gb ₃ [(d18:1)(C18:1)]	0.593	0.333	0.297-0.888	0.014-0.653	0.556	0.355
Gb ₃ [(d18:1)(C20:0)]	0.353	0.139	0.065-0.639	0.000-0.350	0.346	0.045*
Gb ₃ [(d18:1)(C20:0)]Me	-	-	-	-	-	-
Gb ₃ [(d18:1)(C20:1)]	0.278	0.333	0.018-0.538	0.033-0.634	0.157	0.355
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]	0.407	0.194	0.098-0.717	0.000-0.436	0.556	0.090
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]Me	0.333	0.111	0.046-0.621	0.000-0.316	0.289	0.031*
Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)]	-	-	-	-	-	-
Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)]Me	0.296	0.306	0.010-0.582	0.013-0.599	0.195	0.280
Gb ₃ [(d18:1)(C22:2)]	-	-	-	-	-	-
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]	0.315	0.111	0.037-0.592	0.000-0.316	0.239	0.031*
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]Me	0.481	0.611	0.142-0.821	0.285-0.937	0.906	0.537
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]	0.333	0.139	0.047-0.620	0.000-0.354	0.289	0.045*
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]Me	0.148	0.153	0.000-0.355	0.000-0.370	0.025	0.054
Gb ₃ [(d18:1)(C24:2)]	0.352	0.417	0.064-0.640	0.102-0.731	0.346	0.643
Gb ₃ [(d18:1)(C26:0)]	0.546	0.319	0.236-0.857	0.027-0.612	0.768	0.316
Gb ₃ [(d18:1)(C26:1)]	0.315	0.167	0.039-0.591	0.000-0.389	0.239	0.064
Ceramide [(d18:1)(C16:0)]	0.704	0.583	0.422-0.985	0.196-0.971	0.195	0.643
Total Gb ₃	0.333	0.111	0.047-0.620	0.000-0.316	0.289	0.031*

Supplementary Information Table S-21

Leukocytes

	Coefficient of correlation				Significance (<i>p</i> - values)			
	Total Gb ₃ urine	Total Gb ₃ plasma	Total Lyso-Gb ₃ urine	Total Lyso-Gb ₃ plasma	Total Gb ₃ urine	Total Gb ₃ plasma	Total Lyso-Gb ₃ urine	Total Lyso-Gb ₃ plasma
Gb ₃ [(d18:1)(C14:0)]	0.275	0.465	0.293	0.268	0.286	0.034*	0.223	0.286
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]	0.468	0.382	0.358	0.200	0.058	0.088	0.132	0.058
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]Me	0.363	0.374	0.337	0.327	0.152	0.095	0.158	0.152
Gb ₃ [(d18:1)(C16:1)]	0.439	0.509	0.416	0.355	0.078	0.018*	0.077	0.078
Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)]	0.387	0.436	0.312	0.194	0.125	0.048*	0.193	0.125
Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)]Me	0.076	-0.027	-0.042	-0.336	0.772	0.907	0.864	0.772
Gb ₃ [(d18:1)(C18:1)]	0.382	0.606	0.447	0.357	0.130	0.004*	0.055	0.130
Gb ₃ [(d18:1)(C20:0)]	0.015	-0.323	-0.207	-0.534	0.955	0.153	0.395	0.955
Gb ₃ [(d18:1)(C20:0)]Me	0.017	-0.282	-0.275	-0.564	0.948	0.216	0.254	0.948
Gb ₃ [(d18:1)(C20:1)]	0.074	-0.044	-0.040	-0.301	0.779	0.849	0.870	0.779
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]	0.047	-0.370	-0.291	-0.614	0.859	0.099	0.226	0.859
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]Me	0.147	-0.230	-0.200	-0.527	0.573	0.316	0.412	0.573
Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)]	0.039	-0.297	-0.204	-0.532	0.881	0.190	0.403	0.881
Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)]Me	0.174	-0.174	-0.037	-0.412	0.504	0.451	0.881	0.504
Gb ₃ [(d18:1)(C22:2)]	0.157	-0.147	-0.016	-0.352	0.548	0.526	0.949	0.548
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]	0.113	-0.291	-0.256	-0.558	0.667	0.201	0.290	0.667
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]Me	0.181	-0.122	-0.182	-0.496	0.486	0.598	0.455	0.486
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]	0.096	-0.279	-0.268	-0.553	0.715	0.220	0.267	0.715
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]Me	0.037	-0.229	-0.244	-0.527	0.889	0.319	0.314	0.889
Gb ₃ [(d18:1)(C24:2)]	0.189	-0.096	-0.060	-0.410	0.468	0.679	0.808	0.468
Gb ₃ [(d18:1)(C26:0)]	0.100	-0.178	-0.240	-0.505	0.701	0.440	0.322	0.701
Gb ₃ [(d18:1)(C26:1)]	0.213	-0.171	-0.156	-0.483	0.411	0.457	0.523	0.411
Ceramide [(d18:1)(C16:0)]	0.012	-0.058	-0.033	-0.270	0.963	0.801	0.892	0.963
Total Gb ₃	0.311	0.038	-0.002	-0.284	0.224	0.871	0.994	0.224

Supplementary Information Table S-22

B lymphocytes

	Coefficient of correlation				Significance (<i>p</i> - values)			
	Total Gb ₃ urine	Total Gb ₃ plasma	Total Lyso-Gb ₃ urine	Total Lyso-Gb ₃ plasma	Total Gb ₃ urine	Total Gb ₃ plasma	Total Lyso-Gb ₃ urine	Total Lyso-Gb ₃ plasma
Gb ₃ [(d18:1)(C14:0)]	-	-	-	-	-	-	-	-
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]	0.075	0.181	-0.175	-0.032	0.746	0.486	0.447	0.898
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]Me	0.114	0.233	0.004	0.056	0.622	0.368	0.987	0.819
Gb ₃ [(d18:1)(C16:1)]	0.117	0.092	0.248	0.197	0.614	0.726	0.278	0.418
Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)]	-0.084	0.235	-0.165	0.042	0.716	0.363	0.475	0.864
Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)]Me	-	-	-	-	-	-	-	-
Gb ₃ [(d18:1)(C18:1)]	0.101	-0.368	0.131	-0.111	0.662	0.147	0.571	0.652
Gb ₃ [(d18:1)(C20:0)]	-0.279	-0.164	-0.434	-0.330	0.220	0.529	0.049*	0.168
Gb ₃ [(d18:1)(C20:0)]Me	-	-	-	-	-	-	-	-
Gb ₃ [(d18:1)(C20:1)]	-	-	-	-	-	-	-	-
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]	-0.178	0.032	-0.410	-0.305	0.440	0.903	0.065	0.204
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]Me	-0.096	-0.029	-0.452	-0.296	0.679	0.911	0.040*	0.218
Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)]	-0.257	-0.132	-0.470	-0.421	0.260	0.613	0.032*	0.073
Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)]Me	-0.134	-0.029	-0.231	-0.182	0.563	0.911	0.313	0.455
Gb ₃ [(d18:1)(C22:2)]	-	-	-	-	-	-	-	-
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]	0.147	0.150	-0.121	-0.109	0.526	0.567	0.602	0.658
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]Me	0.309	0.243	0.097	0.127	0.173	0.348	0.676	0.604
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]	0.123	0.049	-0.288	-0.211	0.594	0.852	0.205	0.387
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]Me	0.066	-0.402	-0.101	-0.311	0.775	0.110	0.662	0.196
Gb ₃ [(d18:1)(C24:2)]	0.157	0.078	-0.310	-0.286	0.496	0.765	0.171	0.235
Gb ₃ [(d18:1)(C26:0)]	-	-	-	-	-	-	-	-
Gb ₃ [(d18:1)(C26:1)]	-	-	-	-	-	-	-	-
Ceramide [(d18:1)(C16:0)]	-0.126	0.061	-0.114	-0.170	0.586	0.815	0.622	0.486
Total Gb ₃	0.119	0.118	-0.216	-0.123	0.606	0.653	0.348	0.616

Supplementary Information Table S-23

Monocytes

	Coefficient of correlation				Significance (<i>p</i> -values)			
	Total Gb ₃ urine	Total Gb ₃ plasma	Total Lyso-Gb ₃ urine	Total Lyso-Gb ₃ plasma	Total Gb ₃ urine	Total Gb ₃ plasma	Total Lyso-Gb ₃ urine	Total Lyso-Gb ₃ plasma
Gb ₃ [(d18:1)(C14:0)]	0.189	0.384	0.313	0.382	0.468	0.085	0.191	0.088
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]	0.159	0.452	0.396	0.534	0.541	0.040*	0.093	0.013*
Gb ₃ [(d18:1)(C16:0)]Me	-0.221	-0.462	-0.321	-0.292	0.395	0.035*	0.180	0.199
Gb ₃ [(d18:1)(C16:1)]	0.598	0.486	0.379	0.242	0.011*	0.026*	0.110	0.291
Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)]	0.159	0.257	0.323	0.309	0.541	0.260	0.178	0.173
Gb ₃ [(d18:1)(C18:0)]Me	-	-	-	-	-	-	-	-
Gb ₃ [(d18:1)(C18:1)]	0.591	0.561	0.540	0.419	0.013*	0.008*	0.017*	0.058
Gb ₃ [(d18:1)(C20:0)]	0.375	0.244	0.332	0.182	0.138	0.286	0.166	0.430
Gb ₃ [(d18:1)(C20:0)]Me	-	-	-	-	-	-	-	-
Gb ₃ [(d18:1)(C20:1)]	0.193	0.321	0.082	0.285	0.458	0.156	0.740	0.211
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]	0.314	0.130	0.204	0.095	0.220	0.575	0.403	0.683
Gb ₃ [(d18:1)(C22:0)]Me	0.699	0.519	0.607	0.357	0.002*†	0.016*	0.006*	0.112
Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)]	-	-	-	-	-	-	-	-
Gb ₃ [(d18:1)(C22:1)]Me	-0.007	0.025	0.126	0.162	0.978	0.915	0.606	0.482
Gb ₃ [(d18:1)(C22:2)]	-	-	-	-	-	-	-	-
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]	0.400	0.271	0.309	0.245	0.112	0.234	0.198	0.284
Gb ₃ [(d18:1)(C24:0)]Me	0.164	0.188	0.290	0.056	0.530	0.415	0.228	0.808
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]	0.382	0.270	0.314	0.148	0.130	0.236	0.190	0.522
Gb ₃ [(d18:1)(C24:1)]Me	-0.123	0.173	0.145	0.080	0.637	0.454	0.553	0.731
Gb ₃ [(d18:1)(C24:2)]	0.203	0.183	0.179	0.218	0.434	0.427	0.464	0.342
Gb ₃ [(d18:1)(C26:0)]	0.328	0.041	-0.070	-0.119	0.198	0.860	0.775	0.607
Gb ₃ [(d18:1)(C26:1)]	-0.188	0.045	0.007	0.155	0.470	0.848	0.978	0.501
Ceramide [(d18:1)(C16:0)]	0.260	0.275	0.284	0.349	0.314	0.227	0.238	0.121
Total Gb ₃	0.419	0.326	0.375	0.319	0.094	0.149	0.113	0.158

DISCUSSION

Le développement et la validation de la méthode d'analyse du globotriaosylcéramide soit le Gb₃ ainsi que ses isoformes et analogues dans les leucocytes totaux, les lymphocytes B et les monocytes, comportaient de nombreuses étapes et plusieurs défis à relever à chacune des étapes nécessitant de nombreux essais. En fait, plusieurs méthodes ont été développées dans notre laboratoire afin d'analyser le Gb₃ dans différentes matrices notamment dans l'urine, le plasma et les tissus de souris. Pour chaque matrice, il fut important de développer une méthode d'analyse comportant des conditions optimales selon la matrice spécifique à l'étude. Dans le cas de ce projet de maîtrise, la première étape consistait à développer et à optimiser la méthode d'isolation et de purification des cellules sanguines susmentionnées afin d'éviter toutes substances interférentes, tout en optimisant le recouvrement des glycosphingolipides d'intérêt. Plusieurs techniques ont dû être évaluées. Mais celle ayant donné la plus grande pureté des échantillons nécessitait l'utilisation des procédés par EasySep qui consiste en l'élimination par sélection positive des globules rouges à l'aide d'anticorps de glycophorines A. Ce procédé nous a permis d'obtenir un culot de leucocytes purifiés avant de passer à l'étape d'extraction. En ce qui concerne les lymphocytes B et les monocytes, nous avons procédé par une sélection positive à l'aide d'anticorps spécifiques aux marqueurs CD19 pour les lymphocytes B et CD14 pour les monocytes, qui sont présents à la surface de ces cellules.

Puis, la méthode d'extraction du Gb₃ a été optimisée afin d'obtenir la meilleure récupération de Gb₃ tout en évitant les effets de matrice au maximum. Ensuite, la chromatographie liquide ultra performance a été développée en ajustant les gradients de phases mobiles et en choisissant la colonne la plus efficace pour l'obtention d'une séparation optimale des molécules d'intérêt face aux molécules interférentes et ce, toujours en essayant de réduire les effets de matrice et d'avoir le signal le plus élevé. La chromatographie optimale a été rendue possible grâce à une colonne BEH C8 avec une durée d'analyse de 20 minutes entre les échantillons pour l'analyse de 24 molécules différentes. Nous avons préféré une méthode légèrement plus longue afin de bien stabiliser la colonne entre les injections et assurer une séparation maximale des molécules d'intérêt. Finalement, la spectrométrie de masse en

tandem en mode d'acquisition de monitoring de réactions multiples (MRM) a été optimisée en ajustant les paramètres de l'appareil afin d'obtenir le signal le plus élevé.

Ensuite, lorsque la méthode a été développée, il a été important de valider certains paramètres tels la variabilité intrajour et interjours soit la répétition de la méthode plusieurs fois dans la même journée ou plusieurs fois lors de différentes journées; le recouvrement, soit la récupération du Gb₃ suite à l'extraction liquide-liquide; l'évaluation des effets de matrices pour les différents types cellulaires; les limites de détection et de quantification; la stabilité dans le temps selon différentes températures; l'impact du gel et du dégel de l'échantillon; et finalement l'impact de plusieurs transferts dans le verre et dans le plastique.

L'utilisation d'un spectromètre de masse en tandem couplé à un chromatographe liquide ultra performance a eu plusieurs avantages pour ce projet. La chromatographie liquide a d'abord permis de purifier les échantillons en permettant une séparation des molécules interférentes. Puis, grâce au spectromètre de masse en tandem, il a été possible d'obtenir une grande sensibilité lors de la quantification du Gb₃, ce qui a été un précieux atout étant donné que les lymphocytes B et les monocytes étaient en faible abondance dans les échantillons. La grande spécificité de la spectrométrie de masse en tandem permettant l'acquisition en mode MRM a également été avantageuse pour l'analyse des différents isoformes et analogues du Gb₃, soit des molécules ne présentant que de légères modifications au point de vue structurel. Finalement, la possibilité d'analyser les 24 biomarqueurs simultanément a été favorable pour le déroulement du projet.

Cette étude a permis de quantifier de façon relative, les différents groupes du Gb₃ soit 1) les isoformes du Gb₃ avec des acides gras saturés; 2) les isoformes/analogues du Gb₃ avec une double liaison sur l'acide gras ou la sphingosine; 3) les isoformes/analogues du Gb₃ avec deux doubles liaisons sur l'acide gras et la sphingosine ou les deux sur l'acide gras; et 4) les isoformes méthylés du Gb₃. Les analogues du Gb₃ avec une sphingosine hydratée ne furent pas détectés au cours de cette étude.

Les échantillons de 21 patients Fabry ainsi que 20 contrôles sains ont été analysés. Ainsi, il a été possible de comparer la distribution de ces quatre groupes de Gb₃ pour chacun des types

cellulaires au niveau des contrôles sains, des patients Fabry traités et non traités. Nos résultats révèlent qu'aucune différence significative n'a été trouvée dans la distribution des trois types cellulaires au niveau des cohortes à l'étude.

Une des découvertes particulièrement intéressantes provenant de ces analyses a été la présence de Gb₃ méthylés au niveau de tous les types cellulaires chez les patients Fabry ainsi que chez les contrôles sains. Ceci suggère un processus de méthylation directement au niveau des cellules sanguines ce qui renforce l'hypothèse du lien métabolique possible reliant la méthylation du Gb₃, puis la déacylation pour donner le lyso-Gb₃ (Abaoui et al. 2016).

Puisque le nombre de cellules n'était pas les mêmes dans les différents types cellulaires, l'abondance du Gb₃ ne pouvait pas être directement comparée. Ainsi, des proportions exprimées en pourcentage du total de Gb₃ ont été établies, permettant de comparer les leucocytes, les lymphocytes B et les monocytes entre eux. Cette comparaison a permis de découvrir qu'il y avait une proportion accrue de Gb₃ méthylés dans les lymphocytes B et les monocytes pris séparément, comparativement à l'analyse du total des leucocytes. Ceci suggère que les autres cellules présentes dans la fraction des leucocytes, notamment les neutrophiles qui représentent entre 50 et 70% de cette fraction, pourraient avoir une plus faible proportion de Gb₃ méthylés en comparaison avec les lymphocytes B et les monocytes.

Puis, l'abondance relative des isoformes et analogues du Gb₃ dans les différents types cellulaires a été évaluée pour les contrôles sains, les patients Fabry traités et non traités. Selon l'abondance du Gb₃ retrouvée chez les patients Fabry, soit entre les hommes Fabry et les hommes contrôles, nos résultats démontrent des différences significatives au niveau de certains biomarqueurs, permettant une bonne discrimination entre les deux groupes. Les résultats ont aussi démontré une tendance à l'augmentation de céramide [(d18:1)(C16:0)] au niveau des lymphocytes B et des monocytes pour les patients Fabry traités ou non traités comparativement aux contrôles sains. Cette augmentation était fortement significative au niveau des lymphocytes B chez les hommes Fabry non traités comparativement aux contrôles sains. Il a également été possible de constater une constance dans les résultats des biomarqueurs les plus abondants soit le Gb₃[(d18:1)(C16:0)], le Gb₃[(d18:1)(C22:0)], le

Gb₃[(d18:1)(C24:0)] et le Gb₃[(d18:1)(C24:1)] chez les patients Fabry au niveau de l'urine, du plasma et des cellules sanguines.

Il a aussi été possible d'établir des corrélations entre le niveau de sévérité des différentes mutations. Généralement, les mutations faux-sens, soit la majorité des mutations causant la maladie de Fabry, sont moins sévères que d'autres types de mutations (non-sens par exemple). De fait, pour les mutations faux-sens, l'enzyme conserve une activité enzymatique résiduelle, ce qui permet au patient l'élimination d'une certaine quantité de Gb₃ et les résultats de cette étude ont démontré que ces patients ont généralement moins de Gb₃ que les patients ayant d'autres types de mutations. Les patients ayant des mutations non-sens ou des changements de cadre de lecture sont plus gravement touchés par la maladie de Fabry et les résultats de cette étude ont permis de démontrer que certains de ces patients avaient une plus grande accumulation de Gb₃ dans les cellules sanguines que les autres patients avec des mutations faux-sens. Finalement, un patient ayant une mutation p.N215S, soit la variante cardiaque de la maladie de Fabry, faisait partie de la cohorte des hommes non traités par la thérapie d'enzyme de remplacement. Tel que décrit précédemment, la variante cardiaque de la maladie de Fabry résulte en une réduction du Gb₃ chez les patients atteints qui présentent souvent des résultats normaux car la quantité de Gb₃ est du même ordre de grandeur que chez un contrôle sain. Les résultats de cette étude corréleront avec la littérature pour ce qui est de la quantité de Gb₃ retrouvée dans l'urine, dans le plasma, dans les leucocytes et les monocytes. Au point de vue statistique, le patient avec la mutation p.N215S avait une accumulation moindre du Gb₃ comparativement aux trois autres hommes Fabry non traités, ce qui a eu pour effet de diminuer le nombre de résultats significatifs, considérant le nombre peu élevé de patients pour cette étude.

CONCLUSIONS

Concernant notre hypothèse de recherche pour ce projet de maîtrise, nous voulions évaluer si la quantité des isoformes et analogues du Gb₃ serait plus abondante dans le total des leucocytes que dans les lymphocytes B et les monocytes pris séparément et que la distribution des biomarqueurs serait différente dans ces trois types cellulaires. Les résultats de notre recherche ont démontré que la quantité relative des biomarqueurs du Gb₃ était plus abondante au niveau du total des leucocytes comparativement aux lymphocytes B et monocytes. Par ailleurs, la distribution des biomarqueurs s'est avérée différente pour les types cellulaires étudiés.

Nous avons aussi fixé plusieurs objectifs tels ceux de développer et valider une méthode en spectrométrie de masse en tandem couplée à une chromatographie liquide ultra performance pour la quantification relative des isoformes et analogues du Gb₃ dans le total des leucocytes, les lymphocytes B, les monocytes, le plasma et l'urine des patients Fabry et des contrôles sains appariés avec le sexe et l'âge et d'établir des corrélations entre la quantité relative de ces biomarqueurs et le génotype des patients traités ou non. Nous avons réussi à respecter ces objectifs en développant et validant une méthode efficiente par spectrométrie de masse en tandem avec une haute sensibilité, spécificité pour l'analyse simultanée de 24 isoformes/analogues du Gb₃ dans les cellules sanguines susmentionnées.

Les analyses en spectrométrie de masse en tandem nous ont permis de trouver la présence d'isoformes méthylés du Gb₃ au niveau de tous les types cellulaires chez les patients Fabry ainsi que chez les contrôles sains. Ceci vient rejoindre l'objectif principal de ce projet de maîtrise qui était de mieux comprendre les mécanismes biochimiques de la maladie de Fabry et cette découverte laisse présager un lien possible entre le métabolisme du Gb₃ et du lyso-Gb₃ via un processus de méthylation du Gb₃ directement au niveau des cellules sanguines, pour ensuite en arriver à une déacylation pour obtenir au final le lyso-Gb₃.

Les limitations de l'étude étaient principalement au niveau du nombre de patients Fabry (n = 21) recrutés. La raison principale de ce nombre restreint de patients est que les cellules

sanguines devaient être traitées en moins de 12 h suite au prélèvement, par un processus rigoureux afin de maintenir la stabilité des biomarqueurs à l'étude. Les patients étaient aussi très hétérogènes dans leur groupe respectif, notamment en ce qui concerne le patient avec la variante cardiaque p.N215S de la maladie de Fabry. Cette étude ne disposait que de quatre hommes Fabry non traités, le patient avec la variante cardiaque en faisait partie et par conséquent, celui-ci a réduit grandement le nombre de résultats significatifs en augmentant l'écart interquartile entre les résultats. Une autre limitation à l'étude était la correction pour les comparaisons multiples par la méthode de Benjamini et Hochberg qui a dû être faite en raison du grand nombre d'analyses effectuées. Cette correction est une méthode plutôt sévère pour s'assurer que la significativité des résultats n'est pas seulement due au hasard.

Il est possible de stipuler que comme les leucocytes sont tous dérivés des cellules souches hématopoïétiques, soit les hémocytoblastes, ceci peut suggérer une distribution similaire dans les hémocytoblastes à celle observée dans les différents types cellulaires.

Finalement, cette étude a permis d'apporter une meilleure compréhension des processus biochimiques des isoformes et analogues du Gb₃ dans les cellules sanguines, ce qui pourrait améliorer le monitoring des patients Fabry dans le futur. Les perspectives de cette étude seraient d'évaluer le lyso-Gb₃ ainsi que le Ga₂ et leurs isoformes et analogues respectifs dans les mêmes cellules sanguines pour comparer leur accumulation avec celle du Gb₃. Il serait également intéressant d'évaluer un plus grand nombre de patients et de contrôles sains pour augmenter la puissance statistique de cette étude.

REMERCIEMENTS

Je suis profondément reconnaissante envers Christiane Auray-Blais, ma directrice de maîtrise, pour cette merveilleuse opportunité que fut la réalisation de ma maîtrise dans son laboratoire. Merci pour tout le dévouement exceptionnel dans le support que tu m'as apporté, durant ces deux années. Ce fut un véritable plaisir de travailler avec toi; ton enthousiasme, ton dynamisme, ta détermination et tes accomplissements ont toujours été de réelles motivations pour moi. Merci de m'avoir transmis ta passion pour la recherche.

Je tiens à remercier mes parents et ma sœur, qui depuis toujours m'offrent un support inconditionnel dans tous les aspects de ma vie. Votre amour, votre soutien et vos encouragements me permettent de toujours donner le meilleur de moi-même et d'affronter tous les obstacles se dressant sur mon passage.

Merci à l'équipe de laboratoire soit Pamela, Mona, Michel et Mélanie qui m'ont tous aidé à l'accomplissement de mon projet de maîtrise en me transmettant leur savoir et en me guidant dans mes décisions. J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec vous. Merci à Chantal Boivin et Caroline Barr de m'avoir gentiment offert leur aide lors du recrutement de patients et de contrôles sains. Merci à Daniel Bichet, notre collaborateur et à son équipe Marie-Françoise Arthus, Carole Fortier et Claudia Ménard pour votre accueil chaleureux et votre soutien lors de mes visites à votre laboratoire.

Je remercie également les membres du Service de génétique et du département de médecine nucléaire et de radiobiologie. Vous êtes tous des personnes agréables à côtoyer. Merci à toutes les personnes qui ont généreusement donné leur sang pour mon projet de maîtrise, soit autant les contrôles sains que les patients atteints de la maladie de Fabry. Merci au Dr. Joe T.R. Clarke et à M. Darel Hunting d'avoir accepté de réviser mon mémoire.

Finalement merci au Centre de recherche l'Axe Mère-Enfant CIUSSS de l'Estie-CHUS et à nos partenaires de la compagnie Waters Corporation.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Abaoui, M., et al., 2016. Tandem mass spectrometry multiplex analysis of methylated and non-methylated urinary Gb₃ isoforms in Fabry disease patients. *Clinica Chimica Acta*, 452, p.191–198.
- Aerts, J.M. et al., 2008. Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8), p.2812–2817.
- Alipourfetrati, S., Saeed, A. & Norris, J.M., 2015. A Review of Current and Future Treatment Strategies for Fabry Disease: A Model for Treating Lysosomal Storage Diseases. *Journal of Pharmacology and Clinical Toxicology*, 3.
- Angelis, A., Tordrup, D. & Kanavos, P., 2015. Socio-economic burden of rare diseases: A systematic review of cost of illness evidence. *Health Policy*, 119(7), p.964–979.
- Askari, H. et al., 2007. Cellular and tissue localization of globotriaosylceramide in Fabry disease. *Virchows Archiv*, 451(4), p.823–834.
- Auray-Blais, C. et al., 2007. Development of a filter paper method potentially applicable to mass and high-risk urinary screenings for Fabry disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 30(1), p.106.
- Auray-Blais, C. et al., 2009. Proposed high-risk screening protocol for Fabry disease in patients with renal and vascular disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 32(2), p.303–308.
- Auray-Blais, C. et al., 2010. How well does urinary lyso-Gb₃ function as a biomarker in Fabry disease? *Clinica Chimica Acta*, 411(23–24), p.1906–1914.
- Auray-Blais, C. et al., 2012. Urinary globotriaosylsphingosine-related biomarkers for Fabry disease targeted by metabolomics. *Analytical Chemistry*, 84(6), p.2745–2753.
- Auray-Blais, C. & Boutin, M., 2012. Novel Gb₃ isoforms detected in urine of Fabry disease patients: a metabolomic study. *Current Medicinal Chemistry*, 19(19), p.3241–3252.
- Auray-Blais, C., Maranda, B. & Lavoie, P., 2014. High-throughput tandem mass spectrometry multiplex analysis for newborn urinary screening of creatine synthesis and transport disorders, Triple H syndrome and OTC deficiency. *Clinica Chimica Acta*, 436, p.249–255.

- Auray-Blais, C. et al., 2015. Urinary biomarker investigation in children with Fabry disease using tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*, 438, p.195–204.
- Auray-Blais, C. et al., 2017. Biomarkers associated with clinical manifestations in Fabry disease patients with a late-onset cardiac variant mutation Lyso-Gb₃ and analogues. *Clinica Chimica Acta*, 466, p.185–193.
- Barr, C. et al., 2009. Fabry disease urinary globotriaosylceramide/creatinine biomarker evaluation by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in healthy infants from birth to 6 months. *Molecular Genetics and Metabolism*, 97(4), p.278–283.
- Benjamin, E.R. et al., 2016. The validation of pharmacogenetics in the identification of patients with Fabry disease for treatment with Migalastat. *Molecular Genetics and Metabolism*, 117(2), p. S26–S27.
- Blau, N., 2016. Genetics of Phenylketonuria: Then and Now. *Human Mutation*, 37(6), p.508–515.
- Boutin, M. & Auray-Blais, C., 2014. Multiplex tandem mass spectrometry analysis of novel plasma lyso-Gb₃-related analogues in Fabry disease. *Analytical Chemistry*, 86(7), p.3476–3483.
- Boutin, M. & Auray-Blais, C., 2015. Metabolomic Discovery of Novel Urinary Galabiosylceramide Analogs as Fabry Disease Biomarkers. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 26(3), p.499–510.
- Bouwman, M.G. et al., 2011. Impact of growing up with Fabry disease on achievement of psychosocial milestones and quality of life. *Molecular Genetics and Metabolism*, 104(3), p.308–313.
- Bowen, R.A.R. et al., 2005. Effect of blood collection tubes on total triiodothyronine and other laboratory assays. *Clinical Chemistry*, 51(2), p.424–433.
- CORD, 2016, Canadian Organization for Rare Disorder, <https://www.raredisorders.ca>, (page consultée le 10 octobre 2017).
- Chambers, E. et al., 2007. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 852(1–2), p.22–34.
- Clarke, J.T.R., 2007. Narrative review: Fabry disease. *Annals of Internal Medicine*, 146(6), p.425–433.

- Cole, A.L. et al., 2007. Depression in adults with Fabry disease: A common and under-diagnosed problem. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 30(6), p.943–951.
- Cooper & Hausman, 2007. *The cell a molecular approach*. ASM Press, Sunderland, MA; Washington, DC.
- Cox, T.M., 2005. Biomarkers in lysosomal storage diseases: A review. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics*, 94(447), p.39–42.
- Cox, T.M. & Cachón-González, M.B., 2012. The cellular pathology of lysosomal diseases. *Journal of Pathology*, 226(2), p.241–254.
- Crosbie, T.W., Packman, W. & Packman, S., 2009. Psychological aspects of patients with Fabry disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 32(6), p.745–753.
- CTV News, 2017. Calgary man becomes world's first to receive experimental gene therapy <http://www.ctvnews.ca/health/calgary-man-becomes-world-s-first-to-receive-experimental-gene-therapy-1.3289750> (page consultée le 9 octobre 2017).
- Das, A.M., 2016. Pharmacotherapy of inborn errors of metabolism illustrating challenges in orphan diseases. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 81, p.9–14.
- Deegan, P.B., 2012. Fabry disease, enzyme replacement therapy and the significance of antibody responses. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 35(2), p.227–243.
- De Francesco, P.N. et al., 2011. Higher apoptotic state in Fabry disease peripheral blood mononuclear cells. Effect of globotriaosylceramide. *Molecular Genetics and Metabolism*, 104(3), p.319–324.
- DeGraba, T. et al., 2000. Profile of endothelial and leukocyte activation in Fabry patients. *Annals of Neurology*, 47(2), p.229–233.
- Desnick, R.J. & Brady, R.O., 2004. Fabry disease in childhood. *The Journal of Pediatrics*, 144(5), p. S20–S26.
- Desnick, R.J. et al., 2005. Fabry Disease, an Under-Recognized Multisystemic Disorder: Expert Recommendations for Diagnosis, Management, and Enzyme Replacement Therapy. *Annals of Internal Medicine*, 138(4), p.338–346.
- El-Abassi, R., Singhal, D. & England, J.D., 2014. Fabry's disease. *Journal of the Neurological Sciences*, 344(1–2), p.5–19.
- Eng, C.M. et al., 2001. Safety and Efficacy Of Recombinant Human α -Galactosidase A Replacement Therapy In Fabry's Disease. *New England Journal of Medicine*, 345(1),

p.9–16.

- Fan, J.Q., 2003. A contradictory treatment for lysosomal storage disorders: Inhibitors enhance mutant enzyme activity. *Trends in Pharmacological Sciences*, 24(7), p.355–360.
- Fan, J.Q. & Ishii, S., 2007. Active-site-specific chaperone therapy for Fabry disease: Yin and Yang of enzyme inhibitors. *FEBS Journal*, 274(19), p.4962–4971.
- Fauler, G. et al., 2005. Rapid determination of urinary globotriaosylceramide isoform profiles by electrospray ionization mass spectrometry using stearyl-d₃₅-globotriaosylceramide as internal standard. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 19(11), p.1499–1506.
- Ferreira, S. et al., 2015. Variations in the GLA gene correlate with globotriaosylceramide and globotriaosylsphingosine analog levels in urine and plasma. *Clinica Chimica Acta*, 447, p.96–104.
- Futerman, A.H. & van Meer, G., 2004. The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(7), p.554–565.
- Galafold Migalastat, 2017 <http://canada.galafoldamenabilitytable.com> (page consultée le 9 octobre 2017).
- Gámez, A. et al., 2017. Protein misfolding diseases: prospects of pharmacological treatment. *Clinical Genetics*.
- Germain, D.P., 2000. La maladie de Fabry. Aspects cliniques et génétiques. Perspectives thérapeutiques. *Revue de Médecine Interne*, 21(12), p.1086–1103.
- Germain, D.P., 2010. Fabry Disease. *Orphanet Journal Rare Diseases*, 5, p.30.
- Gross, J. H., et SpringerLink, 2011. *Mass Spectrometry: A Textbook*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- HGMD, 2017. Human Gene Mutation Database www.hgmd.org (page consultée le 9 octobre 2017).
- Hoffmann, E. D. et Stroobant, V., 2002. *Mass spectrometry: Principles and Applications*. Wiley, Chichester; New York.
- Hovaguimian, A. & Gibbons, C.H., 2012. Diagnosis and treatment of pain in small fiber neuropathy. *Curr Pain Headache Rep*, 15(3), p.193–200.
- Huang, J. et al., 2017. Lentivector Iterations and Pre-Clinical Scale-Up/Toxicity Testing: Targeting Mobilized CD34+ Cells for Correction of Fabry Disease. *Molecular Therapy*

- Methods and Clinical Development, 5, p.241–258.
- Jorde L. B. et al., 2004. *Génétique médicale*. Elsevier, Paris.
- Kalkum, G. et al., 2016. Paediatric Fabry disease: prognostic significance of ocular changes for disease severity. *BMC ophthalmology*, 16(1), p.202.
- Kampmann, C. et al., 2002. Cardiac manifestations of Anderson-Fabry disease in heterozygous females. *Journal of the American College of Cardiology*, 40(9), p.1668–1674.
- Kebarle, P. & Tang, L., 1993. From ions in solution to ions in the gas phase - the mechanism of electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 65 (22), p.972A–986A.
- Keshav, S., 2006. Gastrointestinal manifestations of Fabry disease. Dans Mehta, A., Beck, Kitagawa, T. et al., 2005. Non-invasive screening method for Fabry disease by measuring globotriaosylceramide in whole urine samples using tandem mass spectrometry. *Molecular Genetics and Metabolism*, 85(3), p.196–202.
- Lavoie, P., Boutin, M. & Auray-Blais, C., 2013. Multiplex analysis of novel urinary lyso-Gb₃-related biomarkers for Fabry disease by tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 85(3), p.1743–1752.
- Lee, K. et al., 2003. A biochemical and pharmacological comparison of enzyme replacement therapies for the glycolipid storage disorder Fabry disease. *Glycobiology*, 13(4), p.305–313.
- Lin, H.Y. et al., 2009. High incidence of the cardiac variant of Fabry disease revealed by newborn screening in the Taiwan Chinese population. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 2(5), p.450–456.
- Linthorst, G.E. et al., 2010. Screening for Fabry disease in high-risk populations: a systematic review. *Journal of Medical Genetics*, 47(4), p.217–222.
- Lloyd-Evans, E. & Haslett, L.J., 2016. The lysosomal storage disease continuum with ageing-related neurodegenerative disease. *Ageing Research Reviews*, 32, p.104–121.
- M.A.G.I.C. Clinic, 2017. Metabolics And Genetics in Calgary Clinic. Clinical Pilot Study of Autologous Stem Cell Transplantation of CD34+ Cells Engineered to Express α -Galactosidase A in Patients with Fabry disease <http://www.magiccalgary.ca/facts.html> (page consultée le 9 octobre 2017).
- MacDermot, K.D., Holmes, A. & Miners, A.H., 2001. Anderson-Fabry disease: clinical

- manifestations and impact of disease in a cohort of 98 hemizygous males. *Journal of Medical Genetics*, 38(11), p.750–760.
- Manwaring, V., Boutin, M. & Auray-Blais, C., 2013. A metabolomic study to identify new globotriaosylceramide-related biomarkers in the plasma of Fabry disease patients. *Analytical Chemistry*, 85(19), p.9039–9048.
- Marieb & Hoehn, 2010. *Anatomie et physiologie humaines*. Pearson, Montréal.
- Marieb & Hoehn, 2013. *Human anatomy & Physiology*. Pearson, Montréal.
- Mehta, A., Beck, M. & Sunder-Plassmann, G., 2006. *Cox, TM Fabry Disease: Perspectives from 5 years of FOS*. Oxford PharmaGenesis, Oxford, UK.
- Mehta, A. et al., 2004. Fabry disease defined: Baseline clinical manifestations of 366 patients in the Fabry Outcome Survey. *European Journal of Clinical Investigation*, 34(3), p.236–242.
- Michaud, L., Auray-Blais, C. 2012. Improved Ways to Screen For Patients With Fabry Disease, Involving Optometry In A Multidisciplinary Approach. *Canadian Journal Optometry*, 74(4), 25-32.
- Michaud, L., 2013. Vascular tortuosities of the upper eyelid: A new clinical finding in Fabry patient screening. *Journal of Ophthalmology*, 2013:207573.
- Mills, K. et al., 2005. Measurement of urinary CDH and CTH by tandem mass spectrometry in patients hemizygous and heterozygous for Fabry disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 28(1), p.35–48.
- Nowak, A. et al., 2017. Plasma Lyso-Gb₃: A useful biomarker for the diagnosis and treatment of Fabry disease heterozygotes. *Molecular Genetics and Metabolism*, 120(1–2), p.57–61.
- Núñez, J.P. et al., 2010. Fabry Disease: A Metabolic Proteinuric Nephropathy, 13, p. 255-277.
- Oder, D., Nordbeck, P. & Wanner, C., 2016. Long Term Treatment with Enzyme Replacement Therapy in Patients with Fabry Disease. *Nephron*, 134(1), p.30–36.
- Parenti, G., Andria, G. & Ballabio, A., 2015. Lysosomal Storage Diseases: From Pathophysiology to Therapy. *Annual Review of Medicine*, 66(1), p.471–486.
- Parham, P., 2003. *Le système immunitaire*. Paris, de Boeck, p.406.
- Parham, P., 2009. *The immune system*. New-York, p.608.

- Picard, M., Wallace, D.C. & Burelle, Y., 2016. The rise of mitochondria in medicine. *Mitochondrion*, 30, p.105–116.
- Pisani, A. et al., 2016. Switch to agalsidase alfa after shortage of agalsidase beta in Fabry disease: a systematic review and meta-analysis of the literature. *Genetics in Medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*, p.1–8.
- Platt, F.M. & Butters, T.D., 2004. Substrate deprivation: A new therapeutic approach for the glycosphingolipid lysosomal storage diseases. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 2(1), p.1–17.
- Provençal, P. et al., 2016. Relative distribution of Gb₃ isoforms/analogues in NOD/SCID/Fabry mice tissues determined by tandem mass spectrometry. *Bioanalysis*, 8(17).
- Ranieri, M. et al., 2016. Fabry Disease: Recognition, Diagnosis, and Treatment of Neurological Features. *Current Treatment Options in Neurology*, 18(7).
- Rao, A.N. et al., 2009. Inborn Errors of Metabolism: Review and Data from a Tertiary Care Center. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 24(3), p.215–222.
- Roddy, T.P. et al., 2005. Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Quantification of Globotriaosylceramide in Plasma for Long-Term Monitoring of Fabry Patients Treated with Enzyme Replacement Therapy. *Clinical Chemistry*, 51(1), p.237–240.
- Rozenfeld, P. et al., 2009. Leukocyte perturbation associated with Fabry disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 32 Suppl 1, p.67–77.
- Rozenfeld, P.A., 2009. Fabry disease: Treatment and diagnosis. *IUBMB Life*, 61(11), p.1043–1050.
- Sandlers, Y., 2017. The future perspective: Metabolomics in laboratory medicine for inborn errors of metabolism. *Translational Research*, p.1–11.
- Schiffmann, R. et al., 2016. Screening, diagnosis, and management of patients with Fabry disease: Conclusions from a “Kidney Disease: Improving Global Outcomes” (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney International*, p.284–293.
- Schiffmann, R. & Ries, M., 2016. Fabry Disease: A Disorder of Childhood Onset. *Pediatric Neurology*, 64, p.10–20.
- Shamriz, O. et al., 2016. Microbiota at the crossroads of autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, 15(9), p.859–869.

- Shrader, S. (2014). *Introductory mass spectrometry*. Taylor and Francis, Boca Raton.
- Sirrs, S. et al., 2010. Baseline characteristics of patients enrolled in the Canadian Fabry Disease Initiative. *Molecular Genetics and Metabolism*, 99(4), p.367–373.
- Sirrs, S.M. et al., 2014. Outcomes of patients treated through the Canadian Fabry disease initiative. *Molecular Genetics and Metabolism*, 111, p.499–506.
- Sirrs, S.M. et al., 2017. *Canadian Fabry Disease Treatment Guidelines*. Halifax, NS.
- Smid, B.E. et al., 2013. A revised home treatment algorithm for Fabry disease: Influence of antibody formation. *Molecular Genetics and Metabolism*, 108(2), p.132–137.
- Snustad, D.P. & Simmons, M.J., 2016. *Principles of genetics*. Hoboken, NJ: Wiley.
- Sridhar, S. et al., 2013. UPLC - a dynamic and expeditious approach to liquid chromatography. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 3(4), p.1139–1152.
- Stockhouse, 2017. Amicus Therapeutics Announces Approval for Galafold™ (Migalastat) for Treatment of Fabry Disease in Canada <http://www.stockhouse.com/news/press-releases/2017/09/14/amicus-therapeutics-announces-approval-for-galafold-migalastat-for-treatment-of> (page consultée le 9 octobre 2017).
- Sweeley, C. & Klionsky, B., 1961. Fabry's Disease: Characterization Novel Classification and as a Sphingolipidosis Partial of a Novel Glycolipid, (172713), p.3148–3151.
- Van Eeckhaut, A. et al., 2009. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: Evaluation of matrix effects. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 877(23), p.2198–2207.
- Van der Tol, L. et al., 2015. Cornea verticillata supports a diagnosis of Fabry disease in non-classical phenotypes: results from the Dutch cohort and a systematic review. *The British Journal of Ophthalmology*, 111(2), p. S109.
- Veltman, J. a & Brunner, H.G., 2012. De novo mutations in human genetic disease. *Nature Reviews. Genetics*, 13(8), p.565–75.
- Wang, R.Y. et al., 2007. Heterozygous Fabry women are not just carriers, but have a significant burden of disease and impaired quality of life. *Genetics in Medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*, 9(1), p.34–45.
- Watson, J. T. et Sparkman, O. D. (2007). *Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications and strategies for data interpretation*. John Wiley & Sons,

Chichester, England.

Xu, H. & Ren, D., 2015. Lysosomal physiology. *Annu Rev Physiol*, 77(1), p.57–80.

Young, E. et al., 2005. Is globotriaosylceramide a useful biomarker in Fabry disease? *Acta Paediatr Suppl*, 94(447), p.51–58.